

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

No 744

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1934

PAR

Georges

G. SANDOR

Docteur ès sciences
Assistant à l'Institut Pasteur
Né le 24 mai 1906, à Budapest (Hongrie)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES ANTIGÈNES
DES MICROBES PATHOGÈNES

Président : M. TIFFENEAU, Professeur.

LAVAL

IMPRIMERIE BARNÉOUD

1934

117

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1934

PAR

G. SANDOR

Docteur ès sciences
Assistant à l'Institut Pasteur
Né le 24 mai 1906, à Budapest (Hongrie)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES ANTIGÈNES
DES MICROBES PATHOGÈNES

Président : M. TIFFENEAU, *Professeur.*

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1934

I. — Professeurs :

MM.

Anatomie	ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale	PROUST.
Physiologie	LÉON BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	ROBERT DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MAURICE VILLARET.
Clinique médicale	{ ACHARD.
	{ BEZANÇON.
	{ CARNOT.
	{ MARCEL LABBÉ.
Hygiène et clinique de la 1 ^{re} enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale	{ CUNÉO.
	{ GOSSET.
	{ GRÉGOIRE.
	{ LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
Clinique d'accouchements	{ BRINDEAU.
	{ COUVELAIRE.
	{ JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	PIERRE DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	LÉON BERNARD
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
Professeurs sans chaire	{ HOVELACQUE.
	{ MULON.
	{ OLIVIER.
	{ VERNE.



II. — Agrégés en exercice :

MM.

ALAJOUANINE . . . Neurologie et Psychiâtrie
BÉNARD (HENRI) . . . Pathologie médicale.
BERNARD (ETIENNE). Pathologie médicale.
BOULIN. Pathologie médicale.
BROCC Pathologie chirurgicale.
BULLIARD. Histologie.
CATHALA Pathologie médicale.
CHABROL Pathologie médicale.
CHEVALLIER. . . . Pathologie médicale.
DOGNON Physique.
DONZELOT Pathologie médicale.
FEY. Urologie.
GALLIARD. Parasitologie.
GASTINEL Bactériologie.
GATELLIER Pathologie chirurgicale.
DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.
GAYET. Physiologie.
GIROUD. Histologie.
HAGUENAU Pathologie médicale.
HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
HAZARD Pharmacologie.
HUGUENIN Anatomie pathologique.
JOANNON Hygiène.
LABBÉ (HENRI) . . . Chimie biologique.
LACOMME. Obstétrique.
LANTUÉJOL. Obstétrique.
LAROCHE (GUY) . . . Pathologie médicale.

MM.

LEMAIRE Pathologie expérimentale.
LEVEUF Pathologie chirurgicale.
M^{lle} J. LEVY Pharmacologie.
LÉVY-VALENSI . . . Neurologie et Psychiâtrie
MOREAU Pathologie médicale.
MOULONGUET . . . Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN Pathologie médicale.
OBERLING. Anatomie pathologique.
PETIT-DUTAILLIS . . Pathologie chirurgicale.
PIEDELIEVRE Médecine légale.
PORTES. Obstétrique.
QUÉNU Pathologie chirurgicale.
RICHET. Physiologie.
SANNIÉ. Chimie biologique.
SENÈQUE Pathologie chirurgicale.
SÉZARY Dermatologie et syphiligraphie.
TROISIÈRE Pathologie expérimentale.
TURPIN. Pathologie médicale.
VALLERY-RADOT
(Pasteur). Pathologie médicale.
VELTER Ophtalmologie.
VIGNES. Obstétrique.
WILMOTH. Pathologie chirurgicale.

III. — Agrégés rappelés à l'exercice pour le service des examens :

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
BUSQUET Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT. . . Physiologie.

MM.

LEROUX Anatomie pathologique.
NEVEU-LEMAIRE . . . Parasitologie.
ZIMMERN Physique.

IV. — Agrégés chargés de cours de clinique annexe à titre permanent :

MM.		MM.	
ABRAMI	} clinique médicale.	ECALLE	} clinique obstétricale.
AUBERTIN.		GUÉNIOT	
BRULE		LE LORIER	
CHIRAY		LÉVY-SOLAL	
DUVOIR		METZGER	
HARVIER			
LIAN			

MM.

BASSET	} clinique chirurgicale.
CADENAT	
HEITZ-BOYER	
MOCQUOT	
MOURE.	
SCHWARTZ	

V. — Chargés de cours :

MM.

CHAILLEY-BERT, agrégé.	Éducation physique.
FREY	Stomatologie.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ.	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur A. CALMETTE

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

In memoriam.

A Monsieur le Docteur L. MARTIN

Membre de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur

Hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur TIFFENEAU

Membre de l'Académie de Médecine
qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse

Hommage respectueux.

A mes maîtres de l'Institut Pasteur
Monsieur A. BOQUET et Monsieur M. MACHEBOEUF

Hommage de reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ANTIGÈNES
DES MICROBES PATHOGÈNES

INTRODUCTION

La biologie est la science où la matière se manifeste à nous à première vue avec un finalisme frappant. Pourtant ce n'est pas la matière elle-même qui est finaliste, ce sont les êtres vivants dont certaines réactions paraissent « dirigées » vers certains buts. Il semble que l'individu, le microcosme, lutte pour sa persistance et pour la perpétuation de l'espèce dont il est membre.

La matière vivante élémentaire est organisée d'une façon qui nous échappe pour le moment. Les relations matérielles avec l'ambiance déterminent entre l'individu et son milieu un cycle continu d'échange d'énergie et de matière. Ces faits ne sont que déterministes et l'explication doit se borner à chercher comment s'est produite cette organisation. L'homme, être raisonnable, porte en soi l'erreur inhérente à sa nature de chercher au delà du « comment » le « pourquoi » ; la science, elle, ne connaît que le « comment », et l'esprit du chercheur se propose uniquement de déterminer et de mesurer les phénomènes physiques qui sont à la base de toutes les manifestations matérielles.

*
* *

La science des infections est une partie de la biologie particulièrement riche en faits de caractère finaliste. Entre l'individu parasité et le parasite une lutte acharnée semble se poursuivre ; le malade parasité semble déployer tous ses moyens de défense et le parasite tous ses moyens d'attaque. Si le malade se défend bien, si son organisme est vigoureux, il sera victo-

rieux ; si la défense est défaillante, si l'organisme est déprimé, taré, sa défaite devient certaine. Le médecin connaît bien ces alternatives et son premier devoir sera de fortifier l'organisme parasité, d'augmenter ses moyens de défense.

Cependant la nature fournit de nombreux exemples de transitions continuelles entre parasitisme et symbiose, et le médecin sait qu'il existe des infections dont l'évolution prend une allure fatale, contre laquelle l'organisme semble désarmé. Je veux parler de ces toxi-infections auxquelles souvent les plus vigoureux comme les plus chétifs succombent, presque irrémédiablement, le tétanos et certaines formes de la diphtérie par exemple.

Le microscope nous permet de pénétrer dans le monde des infiniment petits ; les dimensions des êtres changent, mais leurs actions semblent soumises au même finalisme que celles des êtres humains : tous paraissent lutter pour assurer leur existence et perpétuer leur espèce.

Ce monde microscopique qui fourmille d'individus, se spécialise suivant le principe de DARWIN. En apparence, les plus forts choisissent les aliments dont l'assimilation sera le plus facile, des substances qui ont été organisées, mais sont devenues inertes ; les plus faibles sont obligés de choisir un aliment plus indigeste sous la forme de substances encore vivantes qui résistent à leurs assauts. Les microbes se multiplient avec une vitesse énorme et en raison de leur grand nombre ils sont obligés de se spécialiser, de s'adapter : les saprophytes et les parasites se différencient.

Nous arrivons ainsi à la troisième étape de notre analyse — l'étape physico-chimique. L'expression matérielle de l'adaptation des microbes est en effet d'ordre chimique, plus exactement physico-chimique. Si les êtres vivants plus évolués traduisent leur adaptation par des caractères morphologiques et anatomiques complexes, les microbes les expriment surtout par des sécrétions.

Le principe fondamental qui caractérise l'évolution de la matière vivante dans le temps, c'est l'adaptation ; le monde des microorganismes nous révèle une expression relativement simplifiée de ce principe. Les microorganismes expriment leur adaptation par la présence de sécrétions de nature chimique

mal caractérisée, les diastases pour les microbes saprophytes (*) et les toxines (**) pour les microbes parasites. Les deux groupes de principes se ressemblent par de nombreux points et présentent un intérêt biologique capital par le fait qu'ils sont les représentants physico-chimiques de l'adaptation.

Les microbes parasites, comme les microbes saprophytes, s'adaptent en effet à leur milieu nutritif. D'abord, comme résultat global, les microorganismes ensemencés *in vitro*, sur un milieu nouveau, se développent de mieux en mieux au fur et à mesure que l'on multiplie les passages successifs sur ce nouveau milieu. Ce résultat global est très complexe, des activateurs de la végétation du groupe des vitamines y jouent peut être un rôle, ainsi que la formation d'autotoxines résultant d'un métabolisme inadéquat. Cependant, la vraie cause de cette adaptation consiste toujours dans l'apparition de nouvelles diastases dans le protoplasma microbien.

L'adaptation des microorganismes parasites à leurs hôtes se fait souvent aussi devant nos yeux et affecte une sorte d'allure chimique. Le pouvoir des microbes de se développer dans un organisme vivant prend le nom de virulence dans son sens le plus général (***); le pouvoir de l'organisme de se défendre d'une façon efficace contre l'invasion des microbes s'appelle

(*) Les diastases sont indispensables pour la vie, les microbes parasites en produisent donc aussi, mais en général en très petite quantité. Tous les êtres vivants ont des caractères communs et l'adaptation se manifeste en général par l'exagération de certains de ces caractères; les microbes saprophytes (ferments organisés) sécrètent beaucoup de diastases et c'est leur caractère d'adaptation.

(**) Le terme « toxine » ne convient pas tout à fait pour bien caractériser les produits élaborés par les microbes parasites. Le fait que souvent ces produits ne sont connus par nous que comme des représentants chimiques hypothétiques du conflit entre les microbes et l'organisme parasité, leur a valu un nom plus générique, il faut les appeler de préférence : les antigènes microbiens.

(***) Il nous semble qu'il est plus logique d'éliminer le sens agressif que l'on attribue souvent au terme virulence et de généraliser celle-ci à la propriété microbienne qui permet à tous ceux qui en sont porteurs, de se développer dans un organisme étranger vivant. Cette idée est très bien exprimée par les quelques paroles de L. D. FELTON (*Jour. Exper. Med.*, **56**, **13**, **1932**) « ... there is much evidence in support of the view that virulence is correlated with the ability of a microorganism to grow in or on living animal tissue ».

l'immunité. L'immunité et la virulence peuvent s'exalter par le contact mutuel entre microbes et humeurs organiques.

Les deux expressions microscopiques de la lutte entre l'organisme et les microbes : la phagocytose de METCHNIKOFF et la mort des leucocytes sous l'action de microbes pathogènes, supposent une préparation organique ou microbienne par certains principes qui exaltent ces pouvoirs. Nous avons choisi des termes correspondant à notre point de vue egocentrique, nous avons appelé antigènes les principes microbiens, et anticorps les principes de l'organisme qui prouvent qu'un conflit a eu lieu entre celui-ci et le parasite. Il y a cependant des principes organiques antigènes pour les microbes comme il y a des anticorps microbiens. Les microbes s'adaptent en effet à l'organisme et acquièrent une immunité vis-à-vis de lui. C'est ce fait qui explique l'apparition de cas de plus en plus graves au cours des épidémies. Nous pouvons d'ailleurs exalter artificiellement la virulence des microbes par des passages successifs *in vivo* ou en faisant des cultures dans des sacs de collodion dans le péritoine des animaux ; on peut ainsi transformer un streptocoque saprophyte en un streptocoque pathogène. Les facteurs chimiques de cette adaptation microbienne sont les principes du groupe des agressines (BAIL).

Les antigènes microbiens — liés aux corps des microbes ou diffusibles dans les milieux de culture — forment un ensemble complexe ; chez les animaux et chez l'homme ils donnent naissance à des changements humoraux caractérisés par la présence d'anticorps, dont il est raisonnable de penser qu'ils jouent un rôle prépondérant dans l'infection elle-même et dans le processus d'immunisation qui l'accompagne.

En faisant varier les dimensions du champ d'observation, nous arrivons à ne considérer la lutte finaliste entre l'organisme menacé d'infection et les parasites que comme un cas particulier de l'adaptation. L'adaptation est une propriété générale de la matière vivante, mais, au lieu de considérer son but, l'amélioration de l'espèce, l'esprit scientifique doit s'attacher à rechercher le comment de la constitution physico-chimique qui permet à la matière vivante de détenir cette propriété.

Les ferments organisés et les microorganismes pathogènes sont les supports figurés des propriétés diastasiques et antigé-

niques qui sont liées à des propriétés physico-chimiques de certaines substances ; dans le groupe des antigènes, actuellement, les fractionnements chimiques donnent de beaux résultats. Par contre il semble qu'on se soit peu attaché à étudier le rôle que pourrait jouer la structure physique particulière de ces principes dans leur activité, bien qu'on ait admis qu'elle dépend de l'état colloïdal de leurs supports. Mais peut-on soutenir que le terme colloïdal soit suffisant pour caractériser la structure physique des substances complexes d'origine biologique ?

Dans ce travail nous cherchons à donner une réponse à ces problèmes, mais, en raison de l'obscurité de certains faits, nous serons souvent conduits à émettre des hypothèses. Celles-ci doivent être considérées comme des hypothèses de travail, destinées à imprimer une direction à nos recherches, nous les modifierons dans l'avenir ou nous les rejeterons s'il est nécessaire.

Nous nous proposons d'étudier ici les antigènes des microbes pathogènes d'après l'exemple des antigènes des bacilles de Koch en insistant sur les propriétés physiques particulières de ces principes. En outre, nous résumerons brièvement nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques des diastases, pour comparer celles-ci aux antigènes des microbes pathogènes. Ainsi nous essaierons de montrer la convergence des caractères physiques de ces deux groupes de principes qui paraissent jouer des rôles biologiques de même ordre.

DEUXIÈME PARTIE

RÉSUMÉ DES FAITS ACQUIS ACTUELLEMENT AU SUJET DES ANTIGÈNES ET DES DIASTASES

L'étude des antigènes microbiens est actuellement parvenue à l'étape physico-chimique. Avant d'aborder l'examen des faits acquis à ce sujet, nous nous proposons de résumer brièvement les recherches d'ordre physico-chimique effectuées sur les diastases au cours de ces dernières années. Nous verrons ultérieurement qu'une ressemblance frappante permet de rapprocher diastases et antigènes microbiens; mais cet exposé préliminaire concernant les diastases, nous servira toujours de terme de comparaison avec les antigènes.

CHAPITRE PREMIER

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES DIASTASES

L'activité vitale est en relation étroite avec l'activité catalytique sur les principes immédiats que possèdent certains principes de la matière organisée. Mais, bien que nous connaissions ces catalyseurs biologiques dans leurs effets depuis un siècle, leur constitution chimique n'est pas encore élucidée.

La difficulté d'isoler et de caractériser ces principes résulte de leur grande labilité et de leurs caractères physiques particuliers. Ces caractères physiques se sont précisés de plus en plus au fur et à mesure que nos connaissances sur les diastases s'élargissaient. Une adsorbabilité extraordinaire par tous les précipités et par toutes les substances complexes contenues dans les solutions, et une indifférence polaire (*) remarquable sont les deux propriétés dominantes des diastases. Une substance, douée de ces propriétés à un degré extrême, devient un corps fantôme ; adsorbée partout, sans caractère polaire net, ses propriétés propres tendent à s'évanouir devant celles des autres substances contenues dans les solutions. Un tel corps sera entraîné avec la plus grande facilité et épousera les propriétés des substances complexes auxquelles il se trouvera attaché ; suivant la constitution des milieux il pourrait, au

(*) Le terme *polaire* définit, comme toujours, une propriété électrique. Une molécule polaire est, en effet, comparable à un corps ayant une charge électrique. Nous savons actuellement que pas seulement les acides et les bases proprement dites, mais même la majorité des autres fonctions chimiques peuvent avoir dans certaines conditions des charges électriques (donc des tendances polaires). Il n'est qu'un seul groupe de fonctions chimiques qui paraît être toujours neutre au point de vue électrique, ce sont les fonctions carbures d'hydrogène saturés (les paraffines en particulier).

cours du même fractionnement, présenter tour à tour les propriétés d'un protéide, d'un polyholoside, d'une graisse ou d'un polypeptide. L'isolement d'une telle substance, si la labilité de son activité caractéristique s'y surajoute, deviendra quasi impossible.

*Etat actuel de nos connaissances sur la constitution
physico-chimique des diastases.*

Le nombre énorme de travaux effectués dans le but d'isoler les diastases, n'a abouti qu'à préciser les caractères physiques de leurs supports. Il nous serait à peu près impossible d'énumérer tous ces travaux. Qu'il nous suffise de mentionner les principaux auteurs qui ont lié leur nom à l'étude de cette question : E. FISCHER, BOURQUELOT, E. DUCLAUX, G. BERTRAND, H. HENRI, L. MICHAELIS, E. ABDERHALDEN, H. V. EULER, R. WILLS-TÆTTER et leurs élèves.

Dans le présent chapitre nous nous occuperons plus particulièrement des travaux de l'école de WILLSTÆTTER qui a fourni dans ces derniers temps un effort considérable pour isoler et caractériser les diastases.

Les travaux de fractionnement effectués par WILLSTÆTTER, sont fondés sur l'adsorbabilité extrême des diastases. Une méthode, la méthode d'adsorption élective, fut élaborée par cet auteur en vue de fractionner les diastases. Si j'insiste sur les principes de cette méthode, c'est parce qu'ils nous donnent des renseignements intéressants sur les propriétés physiques des diastases.

Méthode de l'adsorption élective.

Depuis que l'on connaît les diastases, on connaît aussi leur adsorbabilité extraordinaire par les précipités colloïdaux. En effet, déjà PAYEN et PERSOZ, les premiers qui ont eu entre leurs mains un ferment non figuré, ont noté ce fait en étudiant sa précipitation par l'alcool. COHNHEIM fut le premier à employer l'adsorption pour isoler une diastase. Cet auteur adsorbe l'amy-

lase de la salive par un précipité colloïdal de phosphate tricalcique (1). BRUECKE emploie deux adsorptions et éluions successives, une première par le phosphate tricalcique et une deuxième par un précipité de cholestérol, pour isoler la pepsine (2). DANILEWSKI arrive à séparer la trypsine pancréatique de l'amylase, en adsorbant cette dernière isolément par un précipité de collodion (3).

Ce fut L. MICHAELIS qui étudia le premier d'une façon systématique le mécanisme de l'adsorption sélective des diastases (4), (5).

De leurs travaux il semble résulter que les diastases sont adsorbées d'une façon polaire (*), comme les acides ou les bases, par les adsorbants employés. Les diastases apparaissent ainsi comme des substances ayant le caractère polaire des acides, des bases ou des ampholytes.

Les nombreux exemples fournis par WILLSTETTER et ses collaborateurs démontrent cependant que le caractère polaire de l'adsorption des diastases change avec l'état de pureté de ces principes (6) (7) (8). La polarité ne serait pas celle du principe actif, elle ne dépendrait que du colloïde qui tient adsorbé la diastase et cette polarité serait variable, pour une même diastase, selon son support colloïdal. Les électivités polaires ne suffisent que pour un premier fractionnement grossier des diastases ; pour obtenir un fractionnement vraiment spécifique, ce n'est pas le signe de l'adsorbant qui intervient, mais sa constitution chimique. La sélectivité dans le

(1) Cité d'après E. DUCLAUX. *Traité de microbiologie*, t. II, Masson, Paris (1899).

(2) BRUECKE. *Wiener Akad. Sitzungsberichte*, 43. Abt. 2 (1861).

(3) DANILEWSKI. *Virchow. Archiv.*, 25, 279 (1862).

(4) L. MICHAËLIS. *Biochem. Ztschr.*, 7, 488 (1908).

(5) L. MICHAËLIS et M. EHRENREICH. *Biochem. Ztschr.*, 10, 283 (1908).

(*) L'adsorption polaire s'effectue entre des substances de signe électrique contraire ; alumine adsorbera par exemple les colorants acides et la silice les colorants basiques.

(6) R. WILLSTETTER. *Liebig's Ann.*, 425, 1 (1920-21) ; R. WILLSTETTER, J. GRASER et R. KUHN. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, 123, 1 (1922).

(7) E. WALDSCHMIDT-LEITZ et W. DEUTSCH. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, 167, 288 (1927).

(8) W. GRASSMANN et W. HAAG. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 167, 188 (1927).

pouvoir adsorbant des différentes sortes d'alumine qui ont toutes la même polarité, dépendra par exemple de la constitution chimique variable de ces aluminés (1).

La précipitabilité par les sels des métaux lourds est aussi excessivement variable pour une même diastase. La précipitabilité de l'invertine par les sels d'argent dans une même préparation diastasique dépendra, par exemple, de l'âge de cette préparation (2).

Ces travaux de fractionnement échappent à toute règle chimique, de sorte qu'après de longues années de travail sur l'invertine, WILLSTÆTTER doit conclure qu'aucune des propriétés chimiques invoquées (teneur en polyholosides, teneur en certains acides aminés, teneur en phosphore, etc.) ne peut caractériser l'activité saccharasique (2). Les travaux de fractionnement effectués sur la lipase ont abouti au même résultat négatif (3).

Résumé et critique des travaux de l'école de Willstættér.

Les travaux de l'école de WILLSTÆTTER précisent tout d'abord une théorie qui fut émise la première fois sous une autre forme par G. BERTRAND (4). Une diastase serait constituée par une substance active et un support colloïdal. Les résultats obtenus par WILLSTÆTTER, intéressent d'autre part deux autres points : *a*) les propriétés des substances diastasiques actives et *b*) la nature des supports colloïdaux.

(1) R. WILLSTÆTTER et collaborateurs. *Ber. d. d. Chem. Ges.*, **56**, 117, 149 (1923); **57**, 58, 1082 (1924).

(2) R. WILLSTÆTTER, K. SCHNEIDER et A. WENZEL. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **151**, 1 (1926).

(3) R. WILLSTÆTTER et E. WALDSCHMIDT-LEITZ. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **125**, 132 (1923).

(4) G. BERTRAND (*C. R. Acad. ès Sciences et Bull. Soc. Chim.* (1894)) fut le premier à émettre l'hypothèse d'après laquelle une diastase serait constituée d'un groupement catalytique actif de nature métallique et d'un support colloïdal. Cette question de groupements catalytiques métalliques est actuellement beaucoup discutée, on y revient en tout cas, en ce qui concerne les ferments respiratoires (Warburg). Remarquons que dans le présent exposé, nous ne nous occupons pas de la question des groupements catalytiques. Ces derniers existent naturellement, mais dans notre hypothèse ils ne constituent qu'une partie de la molécule diastasique active.

Toutes les substances diastasiques seraient douées d'une adsorbabilité extraordinaire. Cette adsorbabilité serait d'autre part le plus souvent aspécifique et n'aurait en tout cas jamais un caractère polaire. La supposée nature colloïdale des diastases ne suffit pas, à elle seule, pour expliquer ses propriétés. Nous utilisons, en effet, couramment des méthodes de précipitation fractionnée des colloïdes biologiques qui permettent d'obtenir des fractions bien caractérisées d'une façon spécifique. Il en est ainsi pour les différents défécants acides et basiques qui fractionnent très bien les mélanges de colloïdes biologiques en protéides, protides et différents polyholosides. A l'aide d'acide trichloracétique, par exemple, on peut facilement obtenir à partir d'un mélange de polyholosides et de protéides, un précipité de ces derniers chimiquement exempts de polyholosides. Les propriétés physico-chimiques des substances actives diastasiques ne sont donc pas identiques à celles des colloïdes biologiques banaux. Elles sont vraisemblablement des corps tout particuliers, ayant certains caractères chimiques communs qui font qu'ils deviennent des corps fantômes, comme nous l'avons dit dans l'introduction de ce chapitre.

En ce qui concerne la nature des supports colloïdaux des substances actives diastasiques, d'après WILLSTÆTTER, elle serait excessivement variable (1). La même diastase, obtenue à partir de la même cellule pourrait avoir tour à tour un support polyholosidique, protéidique ou protidique. Quelques objections se posent cependant à cette manière de voir. WILLSTÆTTER a été peut-être trop exclusif en ne considérant que des activités dans le fractionnement des diastases et en négligeant leur support matériel. D'autres chercheurs ont dirigé leurs efforts vers d'autres buts et quelques résultats heureux obtenus par eux, permettent peut-être de modifier sensiblement la conception de WILLSTÆTTER.

(1) R. WILLSTÆTTER. *Ber. d. d. chem. Ges.*, 53, 3601 (1927).

Relations entre protéides et diastases ; diastases cristallisées.

Récemment quatre protéides cristallisés, doués de forte activité diastasique, furent obtenus : SUMNER isola l'uréase cristallisée (1), NORTHROP la pepsine et la trypsine cristallisées (2) (3) et CALDWELL, BLOOHER et SHERMAN l'amylase cristallisée (4).

SUMNER traite la farine de Soja par l'acétone à 31,6 p. 100, et, de la solution acétonique, il sépare par refroidissement un protéide cristallisé, appartenant au groupe des globulines. Ce protéide est très actif au point de vue uréasique.

Le protéide cristallisé de NORTHROP s'obtient dans des conditions assez comparables. Cet auteur part des pepsines commerciales. Par dialyse des solutions acides (PEKELHARING (5)), ou par légère acidification des solutions alcalines, un protéide précipite des solutions de ces pepsines ; ce protéide entraîne l'activité peptique. Le précipité de protéides se dissout dans ses eaux-mères à 45 degrés et cristallise par refroidissement. Il se comporte comme une bonne pepsine, mais il se caractérise avant tout par la constance de son activité peptique.

Résumé et discussion.

Quelle est la signification exacte de ces protéides cristallisés ? Des discussions se sont élevées à leur sujet entre WALDSCHMIDT-LEITZ (6) et SUMNER (7) mais, d'après nous, ces deux auteurs ont également raison. Le fait que des protéides cristallisés sont doués d'activité diastasique est très difficile à interpréter au point de vue chimique, mais par contre sa signification biologique est indiscutable.

(1) J. B. SUMNER. *Jour. Biol. Chem.*, **69**, 435 (1926).

(2) J. H. NORTHROP. *Jour. Gen. Physiol.*, **13**, 739 (1929-30).

(3) J. H. NORTHROP et M. KUNITZ. *Jour. Gen. Phys.*, **16**, 267 (1932).

(4) M. L. CALDWELL, L. E. BOOHER et H. C. SHERMAN. *Science*, **74**, 37 (1931).

(5) C. A. PEKELHARING. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **22**, 233 (1896).

(6) E. WALDSCHMIDT-LEITZ. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **206**, 133 (1932).

(7) J. B. SUMNER. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **205**, 219 (1932).

Un protéide cristallisé n'est pas une espèce chimique (S. P. SØERENSEN (1)) ; nous pouvons même dire d'un protéide cristallisé ou non, qu'il n'est jamais une espèce chimique (2), mais qu'il est toujours constitué par un mélange de plusieurs espèces chimiques ; le protéide cristallisé peut donc contenir la substance active fixée sur ses micelles d'une façon ou d'une autre et cette substance active peut exister isolément ou fixée à un autre support (*).

Il est non moins intéressant de considérer un protéide cristallisé doué d'activité diastasique. La cristallisation prouve en effet que des relations assez intimes unissent les diastases aux protéides. SUMNER et NORTHROP ont opéré sur un très grand matériel et ils n'ont pas cherché à pousser loin leur fractionnement, mais ils se sont efforcés de travailler avec le maximum de ménagement. Ils ont peut-être ainsi saisi l'étape vraiment biologique du fractionnement des diastases, celle qui rend compte de l'état où elles se trouvent dans la matière vivante.

Les substances diastasiques actives auraient ainsi dans la matière vivante un ou plusieurs supports colloïdaux bien déterminés, de préférence des protéides, auxquels elles seraient unies d'une façon assez énergique. En dehors de l'existence de protéides cristallisés doués d'activité diastasique, d'autres preuves plaident en faveur de cette idée. Une des plus importantes est la suivante : au cours du fractionnement des diastases, les activités supportées par l'unité de poids des préparations diastasiques tendent souvent vers une limite et quand l'unité de poids supporte plus d'activité que cette valeur limite, la stabilité des préparations diminue en général. NORTHROP fit cette remarque avant d'avoir isolé la pepsine cristallisée et il trouva ultérieurement que la valeur de l'activité des prépara-

(1) S. P. L. SØERENSEN. *C. R. Laboratoire Carlsberg*, vol. 18, n° 5 (1930).

(2) Nous renvoyons le lecteur à la discussion détaillée du problème de constitution physique des protéides qui se trouve dans notre publication antérieure. G. SANDOR. *Le problème des protéides*. Edit. Doin, Paris (1933).

(*) Cette objection a d'ailleurs trouvé une vérification directe dans les travaux récents de DYCKERHOFF et G. TEWES (*Ztschr. f. physiol. Chem.*, 215, 93 (1933)). Ces auteurs démontrent que les protéides végétaux cristallisent dans une solution de pepsine en entraînant dans leurs cristaux de la pepsine et que ces protéides sont, même après une recristallisation, des pepsines actives.

tions stables correspond à l'activité du protéide cristallisé. Une valeur limite fut trouvée aussi pour l'activité saccharasique par WILLSTÆTTER (1) et H. v. EULER (2). H. v. EULER remarqua que, à cette valeur limite de l'activité saccharasique, correspond une teneur constante des préparations en tryptophane. WILLSTÆTTER réussit à augmenter l'activité au delà de cette valeur limite par précipitation au moyen de tanin ou de phosphate de plomb ; parallèlement à cette augmentation de l'activité, la teneur en tryptophane perd sa constance et la stabilité paraît diminuer.

D'autre part, on obtient le plus souvent des protéides en cherchant à isoler les substances qui supportent les activités diastasiques des préparations, du moins lorsque le fractionnement n'est pas trop poussé. A. FODOR a isolé ainsi un protéide comme peptidase de la levure (3) et SHERMAN (4) trouva que l'activité amylasique du suc pancréatique est supportée par un protéide coagulable.

Le support colloïdal des substances actives n'est peut-être pas aussi variable que le comporte la théorie de WILLSTÆTTER et les préparations fractionnées à l'infini, douées de très forte activité, mais en général excessivement labiles, ne sont peut-être que des tronçons diastasiques détachés des complexes qui existaient dans la matière vivante.

En résumé : les diastases sont encore inconnues du point de vue chimique. Les substances qui supportent directement les activités diastasiques ne paraissent pas être des protéides ou des polyholosides banaux, ce seraient des substances complexes, douées d'une grande activité capillaire et tout à fait indifférentes du point de vue polaire. Les substances actives proprement dites seraient supportées par des colloïdes biologiques, polyholosides ou protéides, et ces supports colloïdaux joueraient aussi un grand rôle dans l'activité diastasique.

(1) R. WILLSTÆTTER, K. SCHNEIDER et A. WENZEL. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 151, 1 (1926).

(2) H. v. EULER et K. JOSEPHSON. *Chem. Ber.*, 57, 859 (1924).

(3) A. FODOR. *Kolloidztschr.*, 37, 32 et 159 (1925); 39, 240 (1926).

(4) H. O. SHERMAN, M. C. CALDWELL et M. ADAMS. *Jour. Biol. Chem.*, 88, 295 (1930).

Spécificité et nature de la réaction enzyme-substrat.

Le problème de la constitution des diastases se rattache de très près au problème du mécanisme de leur action. L'idée directrice dans toutes ces recherches réside toujours dans la spécificité des activités diastasiques. C'est en partant de cette notion qu'Emile FISCHER (1) supposa, le premier, l'existence d'une union chimique entre l'enzyme et son substrat comme une première phase indispensable dans la catalyse diastasique. Si la nature de cette union entre l'enzyme et son substrat reste discutée, il est actuellement presque hors de doute qu'elle existe nécessairement dans toute catalyse diastasique.

C'est en partant de l'idée de l'existence d'une union entre la diastase et son substrat qu'a été donnée la première formule raisonnable d'une réaction diastasique. V. HENRI fut le premier à admettre que la réaction enzymatique commence par une réaction chimique entre la diastase et son substrat (2). MICHAELIS et MENTEN reprennent les travaux de HENRI et montrent sur l'exemple de l'invertine que l'on peut donner une représentation théorique de l'action diastasique en appliquant la loi d'action de masse à l'union entre l'enzyme et son substrat (3). D'après ces auteurs cette union serait donc de nature chimique vraie. Par contre d'autres auteurs et BAYLISS en particulier (4), tendent à admettre que le substrat est adsorbé par la diastase.

Si du point de vue du dosage des diastases la détermination de la loi de leur action est d'une importance capitale, nous ne pensons pas que la connaissance de cette loi puisse donner des renseignements définitifs sur la nature de la réaction. En effet, dans l'étude des colloïdes biologiques les lois qui régissent les réactions ne révèlent pas, en général, la nature des forces qui interviennent et qui sont issues des constituants des systèmes, puisque, si on ne connaît pas exactement le poids et la constitution chimique des substances qui réagissent, des formules

(1) E. FISCHER. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **23**, 60 (1898-99).

(2) V. HENRI. *Lois générales de l'action des diastases*. Paris (1903).

(3) L. MICHAELIS et M. L. MENTEN. *Biochem. Ztschr.*, **49**, 333 (1913).

(4) W. M. BAYLISS. *Biochem. Jour.*, **1**, 175 (1906); *Proc. Roy. Soc.*, **84**, 81 (1911).

identiques peuvent être tirées en partant de la loi d'action de masse ou des isothermes d'adsorption de LANGMUIR (*). Seule la

(*) Pour illustrer ces faits, nous rappelons brièvement la théorie de MICHAËLIS et MENTEN. Ces auteurs reprennent et précisent une théorie émise par V. HENRI, d'après laquelle la vitesse d'hydrolyse dépend de la concentration d'un complexe hypothétique formé entre la diastase et son substrat. Nous pouvons donc écrire :

$V_0 = p(\text{D.S.})$. En admettant que la concentration totale du substrat n'est pas sensiblement modifiée par la présence de la diastase et pour une concentration totale invariable de la diastase, on arrive ainsi à la formule suivante :

$$V_0 = p(\text{D.S.}) \frac{S}{S + K}$$

V_0 = vitesse initiale de la réaction diastasique

p = constante

(D.S.) = concentration du complexe diastase-substrat

S = concentration du substrat

K = constante qui dérive de la constante de dissociation du complexe diastase-substrat.

Pour l'action de la saccharase, les auteurs trouvent effectivement une courbe en S caractéristique, en portant dans l'abscisse les logarithmes des concentrations en saccharose et dans l'ordonnée, la vitesse initiale de l'hydrolyse.

Je ne veux pas discuter ici l'exactitude de ces courbes et les modifications apportées à la théorie de MICHAËLIS, je voudrais simplement insister sur le fait qu'exactement les mêmes formules peuvent être obtenues en partant d'une théorie adsorptive des réactions diastasiques et en se basant sur les isothermes d'adsorption de Langmuir (HITCHCOCK. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **48**, 2870 (1926) et FISCHGOLD et AMMON. *Biochem. Ztschr.*, **247**, 338 (1932)). Il n'y a qu'à remplacer la concentration de la diastase par la surface active de cette dernière.

p (D.S.) devient ainsi égale à $p(d)$, formule dans laquelle d est égal à la fraction de l'unité de surface de l'enzyme couverte de substrat. D'après les formules de Langmuir nous pouvons poser :

$$d = \frac{K_1 \cdot c}{K_2 + K_1 c} = \frac{c}{c + K}$$

D'autre part, exactement dans les mêmes considérations que celles qui nous ont amené à la formule de MICHAËLIS, nous pouvons dire :

$$V_0 = p(d) = \frac{c}{c + K_n}$$

(c = concentration en substrat) formule identique à celle donnée par la loi d'action de masse.

Remarquons tout de suite que la formule de LANGMUIR était conçue pour des surfaces métalliques rigides et, pour l'appliquer aux diastases, il fallait supposer que la surface active de ces dernières reste aussi immuable dans une série d'expériences. Les variations de cette surface active pourront, d'autre part, très facilement expliquer les nombreuses exceptions que les réactions diastasiques présentent à la loi d'action de masse.

vérification directe des lois de la stœchiométrie peuvent donner une conclusion définitive et celle-là ne peut se faire que quand on connaît exactement la constitution chimique des systèmes.

Cette question perd ainsi de son intérêt, et d'autant plus qu'elle conduit à négliger toute vue d'ensemble sur le mécanisme d'action des diastases. Nous avons, en effet, tous les intermédiaires depuis l'invertine, à laquelle les lois simples tirées de constantes d'équilibre, sont presque applicables (1), jusqu'à la lipase et la plupart des protidases, où il serait vain de chercher son application.

Si les lois des réactions diastasiques ne sont ni constantes ni parfaitement démontrables, par contre les caractères de la spécificité diastasique sont plus intéressants à considérer. Remarquons tout d'abord que, au rebours de ce que l'on pouvait penser *a priori*, ces caractères de spécificité sont difficilement explicables en supposant l'existence d'une union chimique proprement dite entre l'enzyme et son substrat.

Si, en raison des progrès de nos connaissances sur les réactions diastasiques, la notion de spécificité quasi absolue perd de sa rigueur, les caractères particuliers de cette spécificité tendent à se préciser de plus en plus. C'est ainsi que l'activité saccharasique paraît être supportée par la même diastase que l'activité raffinasiq (2) et on pourrait multiplier les exemples analogues. Il est acquis, cependant, que des fonctions chimiques identiques supportées par des molécules différentes sont lysées d'une façon exclusive par des catalyseurs biologiques différents. Si on compare les différents substrats sur lesquels une même diastase peut agir, une règle se précise : la configuration stérique des substrats exerce une influence prédominante sur la spécificité de la catalyse enzymatique.

Deux caractères de la configuration moléculaire définissent cette règle : 1° L'influence de l'isoméris optiq ; 2° L'influence des atomes ou de fonctions chimiques très éloignés de la fonction proprement dite, soumise à la réaction enzymatique. La spécificité diastasique devient de ce fait différente de la spécificité que nous fait connaître la chimie classique.

(1) R. KUHN. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 125, 1 (1923).

(2) R. KUHN. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, 125, 28 (1923).

Il est vrai que des isomères optiques peuvent se comporter différemment dans des réactions chimiques, c'est le cas, en particulier, pour les réactions des bases optiquement actives avec des acides optiquement actifs. Par contre, il est fort probable que les diastases en général, comme nous l'avons vu précédemment, ne réagissent pas comme des acides ou des bases ; il est d'ailleurs fort difficile de concevoir que des substances indifférentes du point de vue polaire, telles que les stérides, les glucosides ou les polyholosides, contractent des unions salines avec des diastases qui se montrent, elles aussi, indifférentes au point de vue acido-basique.

L'influence des groupements éloignés de la fonction qui subit la réaction diastasique, sur l'activité de la diastase elle-même est un fait bien connu en matière d'enzymologie. Voici des exemples qui intéressent des familles chimiques très différentes. Dans le cas de substrats relativement simples, des groupements en gamma (ou même au delà) peuvent avoir une influence décisive. Ces groupements interviennent soit par leur configuration stérique (par exemple l'influence de la configuration du carbone, dans l'espace, en position gamma dans le cas de la bêta-glucosidase de l'émulsine (1)), soit par la nature des radicaux qu'ils supportent (par exemple l'influence des groupements en gamma sur l'activité arginasique (2)). En chimie classique, des groupements en gamma peuvent, à la rigueur, exercer une influence, mais, dans le cas des réactions diastasiques, d'autres exemples de spécificité montrent des influences encore plus lointaines. Ainsi l'invertine, qui est une alfa-fructosidase, n'agit que sur les osides avec fructose terminal (3). L'influence se prolonge alors sur le carbone en delta.

Les exemples les plus démonstratifs sont offerts par l'étude des protidases. De l'étude quantitative de différentes protidases sur différents substrats E. WALDSCHMIDT-LEITZ (4) conclut à une

(1) B. HELFERICH, S. WINKLER, R. GOOTZ, O. PETERS et E. GUENTHER. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **208**, 91 (1932).

(2) FELIX, MUENDER et DIRR. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **178**, 192 (1928).

(3) A. FODOR et L. FRANKENTHAL. *Biochem. Ztschr.*, **228**, 401 (1930).

(4) E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHÆFFER et W. GRASSMANN. *Ztschr. f. Chem.*, **156**, 68 (1926) ; E. WALDSCHMIDT-LEITZ et K. SIMONS. *Ztschr. physiol. Chem.*, **156**, 99 (1926).

influence de la configuration et de la grandeur moléculaire sur la spécificité enzymatique.

Résumé et discussion.

Nous n'insisterons pas sur l'interprétation de ces faits, parce que les mêmes problèmes vont se poser à nous, à peu près dans les mêmes conditions au sujet des antigènes. La discussion que nous entreprendrons à ce moment s'appliquera aussi, sans modifications, aux diastases. Nous n'insisterons pas non plus sur le problème de la catalyse qui dépasse le cadre de ce travail.

Il nous semble inutile d'admettre des théories tout à fait particulières pour expliquer les caractères non moins particuliers de la spécificité diastasique (voir par exemple la théorie admise par H. v. EULER et K. JOSEPHSON (1)). L'image que nous proposons pour les diastases nous semble devoir rendre compte des faits observés :

Trois constituants essentiels composent une diastase : un groupement chimique actif contenu dans une molécule complexe, elle-même supportée par un colloïde biologique. Les relations entre la molécule (substance active proprement dite), support immédiat du groupement actif, et le ou les colloïdes biologiques, qui en constituent des supports plus lointains, seraient assez intimes et prendraient leur origine déjà dans la matière vivante.

La catalyse diastasique commencerait par une union qui s'effectuerait par l'entremise de forces de valence résiduelle (*) entre le groupement actif de la diastase et, vraisemblablement, la fonction du substrat qui subira le changement chimique. La spécificité diastasique serait conditionnée par l'orientation moléculaire que subit la substance diastasique active de la part de son support colloïdal et par les conditions de voisinage créées par cette orientation moléculaire.

(1) H. v. EULER. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **143**, 79 (1925) ; K. JOSEPHSON. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **147**, 1 (1925).

(*) Le terme de « valence résiduelle » n'est pas très bien défini ; nous entendons sous ce terme la valence de dissolution ou la valence de LANGMUIR qui intervient, en particulier, le plus souvent dans les phénomènes d'adsorption et qui peut se faire valoir entre des atomes ou des radicaux chimiquement complètement saturés.

CHAPITRE II

ANTIGÈNES DES MICROBES PATHOGÈNES

Considérations biologiques.

Les microbes parasites ont la propriété de se développer dans les organismes vivants. Cette propriété suppose nécessairement des qualités particulières de la part de ces germes ; tout organisme vivant est en effet doué de propriétés qui lui permettent de s'opposer d'une façon efficace à la pénétration et à l'invasion par d'autres êtres vivants. La phagocytose, les sécrétions glandulaires, les mouvements d'évacuation des organes creux, le brassage des cils vibratiles de certaines muqueuses, le revêtement cutané et le pouvoir digestif des humeurs constituent un ensemble de « moyens de défense » qui permettent aux organismes supérieurs de rejeter les corps étrangers venus à leur contact, d'englober, de digérer et de détruire ceux qui ont pénétré dans leurs tissus à la faveur d'une effraction des revêtements cutanés ou muqueux.

Les parasites doivent nécessairement avoir le moyen de résister à la phagocytose et au pouvoir digestif des humeurs ou des cellules. Il est non moins sûr que, ce que nous appelons la virulence, doit être liée à l'existence de principes particuliers, sécrétés par les microbes pathogènes ou liés à leur substance.

Ces considérations biologiques nous conduisent à examiner le rôle des antigènes microbiens dans la virulence des microbes et dans l'immunité des organismes, ainsi que le déterminisme des syndromes pathologiques qui relèvent de l'infection.

Les syndromes infectieux ; théorie des toxines.

Un des problèmes les plus importants de la pathologie générale est constitué par le déterminisme des syndromes infectieux. PASTEUR fut le premier à émettre en formules nettes l'idée que ces syndromes sont causés par des sécrétions microbiennes de nature agressive et toxique. Cette théorie, trop finaliste, considérait les microbes pathogènes comme des soldats minuscules qui luttent avec des armes puissantes — des poisons sécrétés — pour détruire un autre organisme et en utiliser les tissus altérés. L'immunité serait dans cet ordre d'idées, une immunité antitoxique ; toute possibilité d'agression de la part des microbes étant abolie, leur rôle pathogène disparaîtrait.

Les toxines microbiennes, déterminants essentiels des syndromes infectieux de certaines maladies, réunissent les deux propriétés requises par la théorie de PASTEUR : elles sont toxiques et antigènes. L'immunité antimicrobienne paraissait ainsi devoir trouver son explication dans l'immunité antitoxique.

Antigènes microbiens.

Cependant, à mesure que nos connaissances sur les microbes se multiplient, la notion de maladie toxique et d'immunité antitoxique perdent de leur importance dans l'explication de la virulence des microbes, de l'immunité et des syndromes infectieux.

Les toxines nous apparaissent actuellement comme des principes tout à fait particuliers, qui réunissent la toxicité primaire et l'activité antigène, mais dont il n'existe que quelques représentants parmi les microbes, les végétaux supérieurs et les animaux (ricine, abrine, venins, etc.). Les microbes producteurs de toxine sont d'autre part, soit des parasites hybrides (nécro-parasites de BAU qui vivent ou à la surface des tissus, comme des vrais saprophytes, comme le bacille de LÖFFLER, ou dans les détritits cellulaires, comme le bacille tétanique), soit des saprophytes purs, tel que le *Bacillus botulinum*.

La notion de toxines, dans le cas des microbes pathogènes, doit être remplacée par la notion plus générale d'antigènes

microbiens. Jusqu'à présent, il n'est pas de théorie générale qui explique la virulence microbienne, l'immunité active des organismes et les syndromes infectieux par des relations entre antigènes microbiens et organismes parasités. Très nombreux sont, en effet, les cas, où des microbes pathogènes végètent indéfiniment dans des organismes immunisés contre ces microbes (par exemple chez les porteurs de germes) (*). En tout cas, l'existence de principes toxiques microbiens n'est aucunement nécessaire pour expliquer les syndromes infectieux. Les microbes sont des corps étrangers; ils mettent en jeu des processus inflammatoires qui sont la réponse commune de l'organisme à tout déséquilibre tissulaire ou humoral. Les phénomènes se compliquent parce que ces corps étrangers ne sont pas inertes; ils entretiennent des relations physico-chimiques avec les principes humoraux ou cellulaires de l'organisme, ils secrètent des principes avec une intensité variable et la nature de ces principes se modifie incessamment; des processus d'hypersensibilité (**), des processus d'intoxication chronique par trouble du métabolisme résultent de cette relation dynamique entre microbes et organismes et cet ensemble complexe rend mieux compte de la plupart des syndromes infectieux que la notion de toxines microbiennes.

Rôle biologique des antigènes des microbes pathogènes.

Ces considérations biologiques justifient le groupement des antigènes des microbes pathogènes en un groupe particulier de principes biologiques. Ils se rangent parmi les antigènes en général, mais les microbes dont ils proviennent, sont doués du

(*) Il ne faudrait, vraisemblablement, pas considérer, comme on a l'habitude de le faire, simplement des antigènes de la part des microbes et des anticorps de la part des organismes parasités. L'échange des principes immunisants est vraisemblablement mutuel et l'intervention des principes antigènes, issus des organismes parasités, pourrait peut-être un jour donner l'image complète des relations entre ces organismes et les microbes.

(**) De nombreux auteurs considèrent ainsi que l'allergie jouerait un rôle prépondérant dans l'immunité (voir par exemple : A. BORDET : *Immunité, antigènes, anticorps*. Dans le *Traité de Physiologie* de G. H. ROGER. Edit. : Masson, Paris (1926), 7. En particulier : p. 421).

pouvoir tout particulier de se développer dans certains organismes étrangers en créant des troubles morbides. L'organisme parasité acquiert lentement des dispositions nouvelles à leur égard, il les élimine ou les détruit et devient en même temps réfractaire à une nouvelle invasion par les mêmes microbes.

Les propriétés particulières des microorganismes pathogènes et les modifications qu'ils provoquent dans l'organisme doivent être en relation avec les substances d'origine microbienne qui, isolées de leur substrat figuré, provoquent des transformations humorales traduites par la présence d'anticorps. L'étude physico-chimique des antigènes microbiens pourrait donc nous éclairer sur les causes de la virulence des microbes et le déterminisme des syndromes infectieux et des processus d'immunisation.

Le problème est d'actualité. Dans la synthèse biologique des affections pneumococciques, de beaux résultats viennent en effet d'être obtenus grâce à l'étude physico-chimique des antigènes des pneumocoques. Ces résultats ne furent eux-mêmes obtenus que du fait de l'évolution de nos connaissances sur les antigènes en général et sur les antigènes microbiens en particulier. Nous allons résumer ces faits aussi brièvement que possible en ne mentionnant que les plus importants.

Aspect physico-chimique du problème.

Antigènes en général. Remarques d'ordre général.

Ne sont antigènes que les protéides naturels, tel était le principe qui résultait des études physico-chimiques de l'immunité (1). Deux remarques s'imposent à ce sujet :

1^o Protéide naturel est plutôt une définition physique que chimique ; un protéide naturel est constitué principalement par un agrégat de polypeptides, mais ses micelles peuvent contenir

(1) Voir en particulier : H. G. WELLS. *The Chemical Aspects of Immunity*. Edit. : *The Chemical Cat. Cy* (1925).

des quantités variables (jusqu'à 40 à 50 p. 100 de leur poids) de lipides et de glucides (1) (2).

2° Des préparations antigéniques, ne contenant pas de quantités décelables de protéides furent obtenues en assez grand nombre (*); l'entraînement de faibles quantités de protéides demeure cependant, en l'espèce, toujours possible.

Ces deux ensembles de faits semblent démontrer l'action d'un certain état physique plutôt que celle de la nature chimique de l'antigène.

Il nous semble plus rationnel de dire : « ne sont antigènes que les colloïdes biologiques, dont les représentants de beaucoup les plus nombreux : les protéides naturels, constituent les exemples les plus démonstratifs ». L'activité antigène ne semble pas dépendre d'une structure chimique bien déterminée, toujours la même, mais, pour se manifester, elle a besoin d'un support complexe. Ce support reste, le plus souvent, le représentant le plus caractéristique des colloïdes biologiques : un protéide.

Si la cause exacte de la qualité antigène d'une substance reste ignorée, les conditions physiques de la conservation de

(1) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. Laboratoire Carlsberg*, vol. 18, n° 5 (1930).

(2) M. A. MACHEBŒUF. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Paris (1928). G. SANDOR. *Le problème des protéides*. Edit. : Doin et Cie, Paris (1933).

(*) Il ne s'agit pas des antigènes *in vitro*, où l'on trouve certainement les représentants des groupes les plus variés des principes immédiats (les haptènes lipoidiques, polyholosidiques, etc.), mais d'antigènes vrais non protéidiques. Pour n'en citer que quelques-uns, nous pouvons considérer les travaux de FORD (*Jour. Inf. Dis.*, 3, 491 (1906); 4, 541 (1907); *Jour. Biol. Chem.*, 2, 273 (1907)) et d'ACREE et SIMMS (*Jour. Pharm.*, 2, 195 (1910); 4, 235 (1913)) au sujet des toxines des champignons et les travaux de K. MEYER (*Ztschr. f. Immunitätsf.*, 14, 355 (1912)) et de BOQUET et NÈGRE (*Ann. Inst. Pasteur*, 37, 787 (1923)) au sujet des lipides des bacilles tuberculeux. Nous pouvons compléter la série de ces exemples par les résultats des travaux récents sur les polyholosides spécifiques des pneumocoques. Ceux-ci sont, en effet, exempts de protéides et considérés comme des haptènes typiques. Cependant, certains auteurs (TILLET et FRANCIS. *Jour. Exper. Med.*, 52, 373 (1930)); FINLAND et SUTLIFF. *Jour. Exp. Med.*, 54, 637 et 653 (1931)) ont montré que ces polyholosides, administrés en injection intradermique, provoquent la formation d'anticorps. ZOZAYA et CLARK (*Jour. Exp. Med.*, 57, 21 (1933)) trouvent enfin que les polyholosides spécifiques purifiés des pneumocoques peuvent donner une immunité active à eux-seuls, s'ils sont administrés en quantité très faible.

cette qualité ont été l'objet d'études très approfondies. On admet en général que le pouvoir antigène des colloïdes biologiques est une propriété relativement stable. Cette propriété résisterait en particulier au chauffage, à l'acidité, elle serait par contre détruite en milieu fortement alcalin, par les rayons ultra-violets et par les ferments protéolytiques (1). Remarquons que cette stabilité supposée du pouvoir antigène est un peu exagérée.

Remarquons d'autre part que jusqu'à présent on n'a jamais pu obtenir un antigène synthétique proprement dit : le support spécifique, le colloïde biologique, est indispensable et ce support doit apporter avec lui une qualité particulière encore ignorée. Cette qualité est d'ailleurs vouée à disparaître d'une façon définitive sous l'influence de changements physico-chimiques plus ou moins bien connus.

Nous reviendrons plus loin sur cette question. Dans l'exposé qui suit, nous supposerons la qualité antigène acquise et nous résumerons l'aspect chimique du problème.

Résumé historique.

Logiquement il conviendrait de diviser notre exposé en deux parties : 1^o l'étude des antigènes protéïdiques et 2^o l'étude des antigènes cellulaires. Du fait que les protéïdes naturels sont des parcelles de la matière vivante, les résultats obtenus dans l'étude des protéïdes comme antigènes s'appliqueront, pour ainsi dire sans restriction, aux antigènes cellulaires. De ceux-ci les plus divers sont les microbes, dont nous savons actuellement que certains groupements chimiques déterminés supportent l'activité antigène. Nous devons la connaissance de ces faits à l'étude des antigènes protéïdiques. Dans ce cas, comme dans celui des antigènes cellulaires, à en juger d'après la spécificité, certains groupements chimiques bien déterminés, attachés au complexe protéïde, semblent supporter l'activité antigène. Nous réunirons donc ci-dessous l'étude des antigènes protéïdiques et l'étude des antigènes cellulaires.

(1) H. G. WELLS. *The Chemical Aspects of Immunity*. Edit. : *The Chemical Cat. Cy* (1925). En particulier p. 40.

Travaux de K. LANDSTEINER

Les travaux modernes, fondés sur les idées de P. EHRLICH, démontrent deux faits :

1° La spécificité d'un antigène protéidique dépend de certains groupements chimiques attachés au complexe protéidique ;

2° Les groupements chimiques qui déterminent la spécificité des antigènes peuvent aussi exister isolément, en particulier, dans le cas des antigènes cellulaires.

Ces beaux résultats qui éclairent le problème des antigènes, furent surtout obtenus par K. LANDSTEINER et indirectement par P. EHRLICH.

La théorie d'EHRLICH était une théorie chimique excessivement simple. Elle supposait l'existence de groupements chimiques bien déterminés dans les antigènes et ces groupements chimiques devaient trouver leur correspondant en quelque sorte géométrique dans les anticorps pour être saturés (*). En l'absence de résultats expérimentaux nets, cette théorie restait hypothétique.

Les expériences de LANDSTEINER ont vérifié la théorie d'EHRLICH en précisant la notion de groupements chimiques fixateurs spécifiques (groupements haptophores d'EHRLICH) qui déterminent la spécificité des réactions entre antigènes et anticorps.

PICK et OBERMAYER (1) furent les premiers à montrer que de

(*) Je ne parle ici que d'une partie de la théorie d'EHRLICH, celle qui traite des relations en quelque sorte statiques entre antigènes et anticorps. L'autre partie s'occupe de la formation des anticorps et suppose que les anticorps, tout préformés en faible quantité dans l'organisme neuf, se produisent en grande quantité sous l'influence de l'antigène correspondant. Cette partie de la théorie d'EHRLICH est certainement inexacte. Les anticorps spécifiques peuvent en effet se former sous l'influence d'antigènes artificiellement déformés, doués d'une nouvelle spécificité et il serait absurde de supposer que ces anticorps existent préformés dans l'organisme neuf. Le mécanisme de formation des anticorps reste encore à peu près complètement ignoré, par contre des faits assez nets intéressent les relations entre structure chimique et spécificité des antigènes. Ce sont ces faits que nous allons réunir ici pour revenir plus loin brièvement sur le problème encore mystérieux du mécanisme de la formation des anticorps.

(1) PICK et OBERMAYER. *Wiener.klin. Wchschr.* (1903), n° 22 (1904), n° 10 (1906), n° 12.

nombreuses influences physico-chimiques (chaleur, acide, alcali, formol, toluol, agents oxydants) sont capables de changer d'une façon spécifique l'aptitude antigénique des protéides. La plupart de ces changements n'abolissent cependant pas la spécificité d'origine des protéides. Ainsi, si on injecte plusieurs fois à un lapin du sérum de cheval, traité par exemple par du formol, le sérum de ce lapin acquiert la propriété de précipiter *in vitro* le sérum de poulet traité par du formol, tout autant que le sérum de cheval traité par le même réactif; ce sérum continuera cependant à précipiter le sérum de cheval non traité par le formol. Dans ces expériences, à la spécificité primitive, à la spécificité zoologique des protéides, une nouvelle spécificité semblait se surajouter. Cette spécificité était en relation étroite avec le changement chimique subi par les complexes protéidiques; et les protéides formolés, traités par le toluol ou la chaleur, ont présenté des réactions croisées indépendamment de leur origine zoologique.

OBERMAYER et PICK trouvent cependant trois réactifs qui peuvent, grâce à une influence suffisamment profonde, abolir complètement la spécificité d'origine des protéides. Les protéides du sérum, traités par l'iode, l'acide nitreux ou l'acide nitrique, donnent ainsi naissance à des anticorps qui ne réagissent plus avec les protéides du sérum homologue non traités, mais qui réagissent par contre très bien avec des protéides quelconques traités par les mêmes réactifs.

Ces faits furent précisés par les travaux ultérieurs (1) (2). Dans ces travaux cependant la nature exacte des changements chimiques qui donnent naissance aux nouveaux antigènes, reste obscure; on ne pouvait pas préciser avec exactitude quels étaient les groupements des molécules protéidiques qui subissent des changements et de quel facteur dépend la nouvelle spécificité offerte par les protéides changés.

LANDSTEINER s'efforça de préciser ces points et, après des essais infructueux (3), réussit dans sa tâche en employant des complexes qu'il appelle des « azoprotéides » (4). Il fait réagir un

(1) Th. MUELLER. *Centralbl. f. Bakteriologie*, **32**, 521 (1902).

(2) H. FREUND. *Biochem. Ztschr.*, **20**, 505 (1909).

(3) LANDSTEINER. *Biochem. Ztschr.*, **58**, 362 (1913); **61**, 458 (1914).

(4) K. LANDSTEINER et H. LAMPL. *Biochem. Ztschr.*, **86**, 343 (1918).

très grand nombre de différents diazoïques aromatiques sur les protéïdes du sérum; ces groupements sont fixés sur les fonctions phénoliques (tyrosine et histidine) des protéïdes (méthode de PAULY (1)). Tous ces diazoïques réagissent d'ailleurs de la même façon avec les protéïdes et on est autorisé à admettre que les nouveaux complexes formés, les azoprotéïdes, ne diffèrent entre eux que par la nature du groupement aromatique introduit dans les protéïdes. Ces complexes restent d'autre part solubles et conservent entièrement leur valeur antigène.

Des lapins furent injectés plusieurs fois avec les différents azoprotéïdes et on essaya leur sérum par la réaction de précipitation vis-à-vis de l'antigène homologue et de différents antigènes hétérologues; les résultats obtenus ont été les suivants :

Les azoprotéïdes ont des spécificités différentes de celles des protéïdes non traités. Les différents azoprotéïdes, obtenus à partir du sérum d'une même espèce, ont encore souvent des réactions de précipitations communes; sauf quelques exceptions, la spécificité d'espèce persiste. Pour bien juger les résultats obtenus il faut donc employer, comme antigène précipitant, un protéïde d'une autre espèce que celle qui a servi pour la production des anticorps. En opérant de cette façon on observe que :

1° Tous les protéïdes traités par le même diazoïque réagissent avec le sérum de lapin injecté avec l'azoprotéïde homologue;

2° les protéïdes traités par divers diazoïques ne réagissent pas avec un protéïde traité par un diazoïque différent.

L'étude approfondie de cette spécificité chimique montre une analogie frappante avec les faits observés dans la spécificité naturelle des antigènes. Comme on observe des réactions de groupe entre espèces voisines, on peut observer des réactions communes entre des groupements chimiques similaires. Dans les réactions croisées, la réaction la plus intense s'observe cependant en général avec l'azoprotéïde homologue. Dans quelques cas exceptionnels, des antigènes contenant des diazoïques très semblables peuvent produire des réactions également intenses. Certains faits parallèles existent dans le domaine de l'immunologie naturelle où des groupes microbiens donnent

(1) W. PAULY. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, 42, 512 (1914); 99, 54 (1917).

des réactions identiques, par exemple le groupe coli-typique.

Ainsi, ces expériences précisent la nature chimique de la spécificité des antigènes. Les divers azoprotéides ne diffèrent en effet entre eux que par la nature des groupements aromatiques ; la spécificité est donc déterminée par ceux-ci seulement. D'ailleurs, on est autorisé à admettre que la spécificité des antigènes naturels est déterminée aussi par la constitution chimique de certains groupements attachés aux grands complexes protéidiques. Les résultats d'une deuxième série d'expériences (1) entreprise par LANDSTEINER tendent d'autre part à démontrer que les anticorps réagissent bien avec le groupement chimique déterminant la spécificité. L'auteur examine le comportement des mélanges de l'anti-sérum avec l'acide aromatique dont le dérivé diazoïque a été copulé avec les protéides pour former l'antigène. Ces mélanges ne précipitent pas, mais lorsqu'on leur ajoute l'antigène complet (l'azoprotéide homologue), la précipitation spécifique ne s'effectue plus. Cet empêchement de la précipitation est spécifique, il ne se produit, en effet, qu'avec l'acide qui constitue le radical de l'azoprotéide antigène (2).

Enfin, dernièrement, LANDSTEINER réussit à démontrer directement que les réactions sérologiques entre anticorps et antigènes, se font réellement par l'intermédiaire des groupements introduits artificiellement dans les protéides (3). L'auteur emploie, pour immuniser les animaux, des protéides copulés avec des substances plus complexes que celles employées dans les premières expériences. Ce sont des acides amino-analiniques avec des chaînes latérales aliphatiques comptant jusqu'à 8 atomes de carbone. Le sérum de ces animaux donne des réactions de précipitation nettes avec les mêmes acides amino-analiniques copulés avec la résorcine ou la tyrosine. Il semble donc qu'une substance relativement simple, l'acide libre, réagit avec les anticorps tout autant que le protéide complet qui supporte le même acide aminé lié à ses micelles.

(1) K. LANDSTEINER. *Biochem. Ztschr.*, **93**, 106 (1919) ; **104**, 280 (1920).

(2) La méthode d'empêchement spécifique des réactions de précipitation fut préconisée par HALBAN et LANDSTEINER (*Muenchener med. Wchschr.*, 1902, n° 12) ; cette méthode prouve qu'une réaction a eu lieu entre antigènes et anticorps.

(3) K. LANDSTEINER et J. van der SCHEER. *Jour. Exp. Med.*, **56**, 399 (1932).

*Application de la théorie de LANDSTEINER
sur les antigènes partiels des cellules ; haptènes.*

Les résultats chimiques obtenus par LANDSTEINER, ne tardèrent pas à être transposés dans le domaine de l'immunologie et des faits analogues furent observés dans le comportement de certains antigènes cellulaires.

La spécificité des antigènes est déterminée, nous l'avons vu, par certains groupements chimiques attachés aux complexes antigéniques. Ces groupements, quand ils sont isolés, réagissent avec les anticorps *in vitro*, mais ils sont incapables de produire des anticorps dans l'organisme vivant. Il en est ainsi de certains extraits cellulaires qui réagissent avec le sérum, obtenu par l'injection à l'animal de la cellule complète, bien qu'ils se montrent incapables de produire des anticorps. L'antigène hétérogénétique de FORSSMANN (1) en constitue un exemple typique. Cet antigène est contenu dans certains organes animaux et ces organes, ou leurs extraits par l'eau salée, produisent des hémolysines anti-mouton chez les animaux injectés. L'extrait alcoolique de ces mêmes organes ne produit jamais d'anticorps *in vivo*, mais il fixe le complément en présence de l'anticorps spécifique (2).

De ces faits LANDSTEINER, en partant de ses observations sur les azoprotéides, donne l'explication suivante (3) :

Dans l'extrait alcoolique, le groupement spécifique de l'antigène complet existerait à l'état libre et, sous cette forme, il serait incapable de produire des anticorps, mais il réagirait encore très bien avec les anticorps homologues. Dans les cellules

(1) FORSSMANN. *Biochem. Ztschr.*, 37, 78 (1911).

(2) FORSSMANN et FEX. *Biochem. Ztschr.*, 61, 6 (1914); l'extrait salin des organes est d'ailleurs un mauvais antigène fixateur *in vitro*. L'antigène *in vivo* et l'antigène *in vitro* apparaissent ainsi, dans les travaux de FORSSMANN, comme étant différents, ce qui rend incompréhensible les faits immunologiques. Les antigènes lipoidiques sont cependant en général de très mauvais antigènes fixateurs lorsqu'ils sont en solution aqueuse et ils ne fixent bien le complément que si l'on part de leur solution alcoolique. Les extraits salins de FORSSMANN contenaient ainsi l'antigène tout autant que ses extraits alcooliques, seulement cet antigène était sous une forme cachée dans sa solution aqueuse.

(3) LANDSTEINER. *Biochem. Ztschr.*, 119, 294 (1921).

broyés ou dans l'extrait aqueux de ces cellules, le groupement spécifique existerait attaché à des protéides et seul ce complexe pourrait donner naissance à des anticorps. Le groupement spécifique, libéré de ses attaches protéidiques, est ainsi devenu un antigène incomplet, tout comme les radicaux libres des azoprotéides. LANDSTEINER désigne ces antigènes incomplets par le nom de « haptène »; les haptènes de LANDSTEINER seraient donc des antigènes réactionnels, des sortes de groupements haptophores d'EHRlich isolés.

LANDSTEINER apporte d'ailleurs la démonstration directe de son hypothèse (1) en montrant que si on mélange une émulsion aqueuse d'extrait alcoolique avec du sérum de porc (méthode préconisée par PICK et SCHWARZ (2)), l'antigène de FORSSMANN devient de nouveau antigène *in vivo*. Des recherches ultérieures montrèrent que l'on peut généraliser ces faits à d'autres antigènes contenus dans les extraits alcooliques des organes (3).

Antigènes des microbes pathogènes.

Théorie de LANDSTEINER et antigènes des microbes pathogènes; antigènes partiels.

L'exemple des azoprotéides donne une explication simple du comportement des divers antigènes et fournit un plan de travail d'une fécondité extraordinaire.

LANDSTEINER suppose qu'un nombre relativement élevé d'haptènes différents peut être attaché à une même cellule et donner naissance à un grand nombre d'anticorps différents (4). Il fut amené à cette idée par la constatation de l'existence d'antigènes identiques (ou semblables) dans des cellules d'individus appartenant à des groupes très éloignés de l'échelle zoologique ou botanique (antigènes hétérogénétiques et antigènes lipoidiques des hématies). Cette supposition est en accord avec les faits

(1) LANDSTEINER et SIMMS. *Jour. Exp. Med.*, **38**, 127 (1923).

(2) PICK et SCHWARZ. *Biochem. Ztschr.*, **15**, 453 (1908).

(3) LANDSTEINER et van der SCHEER. *Jour. Exper. Med.*, **40**, 91 (1924).

(4) LANDSTEINER et van der SCHEER. *Jour. Exp. Med.*, **42**, 133 (1925).

constatés au sujet des microbes pathogènes. Un microbe pathogène contient en effet plusieurs antigènes différents, un ou plusieurs antigènes protéidiques, des antigènes polyholosidiques et des antigènes lipoïdiques. Certains de ces antigènes peuvent exister isolément et constituer dans cet état des haptènes vis-à-vis des sérums de malades. On peut donc admettre que ces haptènes sont les antigènes de l'infection considérée, attachés aux corps microbiens. Ainsi, on peut faire ce que nous pourrions appeler « la synthèse antigénique d'une infection », d'après l'analyse chimique des microbes ou de leurs sécrétions et en mesurant l'activité précipitante ou fixatrice des différentes fractions antigéniques vis-à-vis des sérums de malades ou des sérums expérimentaux.

Travaux de H. ZINSSER.

Le mérite revient à ZINSSER et à ses collaborateurs (1) d'avoir démontré que, dans un grand nombre d'infections et pour chacune d'elles, il existe plusieurs antigènes. Pour les streptocoques, pour les pneumocoques, pour le bacille d'EBERTH et pour le bacille tuberculeux, ZINSSER trouve deux haptènes foncièrement différents. Ces haptènes peuvent être isolés indifféremment des extraits microbiens et des filtrats de culture; ils fixent le complément ou produisent des précipitations en présence des sérums expérimentaux obtenus par injection de microbes vivants ou tués, à des animaux. L'un de ces principes précipite, en général, par acidification des filtrats et présente les réactions des protéïdes. ZINSSER l'appelle : *le nucléo-protéïde* (*); l'autre principe reste dans les filtrats et précipite en général par l'alcool concentré — ZINSSER l'appelle : *l'antigène résiduel*. Le nucléo-protéïde est un antigène vrai, mais les anticorps, auxquels il donne naissance, ne réagissent *in vitro* qu'avec le nucléoprotéïde et restent indifférents devant l'antigène résiduel; l'antigène résiduel n'est pas antigène *in vivo*, mais il réagit en pré-

(1) H. ZINSSER. *Jour. Exp. Med.*, **34**, 495 (1921); **37**, 275 (1923); **42**, 344 (1925).

(*) La définition employée n'est justifiée aucunement, plusieurs espèces de protéïdes précipitent en effet en milieu acide : les globulines en solution diluée, les glucoprotéïdes et tous les protéïdes partiellement dénaturés.

sence des sérums obtenus avec des corps microbiens totaux.

Les travaux de ZINSSER manquaient de précision, surtout au point de vue chimique, mais ils avaient le mérite d'ouvrir une voie féconde. L'analyse chimique a montré que l'antigène résiduel de ZINSSER est en général un polyholoside (HEIDELBERG et AVERY, LANCEFIELD, TOMCSIK). Le rôle de ces polyholosides dans l'immunité, dans l'infection et dans la virulence des microbes fut étudié et leur analyse, par HEIDELBERGER, AVERY et leurs collaborateurs, a donné de beaux résultats en ce qui concerne les infections pneumococciques.

*Travaux chimiques et immunologiques sur les antigènes
des pneumocoques.*

Dans l'analyse des infections pneumococciques, des recherches sérologiques ont préparé la voie aux travaux chimiques. DOCHEZ et AVERY (1), en reprenant les travaux de NEUFELD (2), WADSWORTH (3) et PANICHI (4), démontrent qu'une substance sécrétée par les pneumocoques, est précipitée d'une façon spécifique par le sérum des sujets atteints de pneumococcie. Cette même substance existe souvent dans le sérum et dans l'urine des malades et sa présence dans les humeurs des sujets infectés est un signe pronostique fâcheux. La substance précipitante est soluble dans l'eau et précipite de ses solutions aqueuses par l'alcool ou l'acétone; elle est d'ailleurs spécifique pour les différents types de pneumocoques, DOCHEZ et AVERY le désignent donc sous le nom de *substance soluble spécifique*.

HEIDELBERGER et AVERY reprirent ces études sérologiques en les complétant par des fractionnements chimiques (5). Ils ont démontré que *la substance soluble spécifique* est un polyholoside et qu'aux trois types de pneumocoques correspondent trois polyholosides foncièrement différents. Ce résultat confirme ainsi une

(1) A. R. DOCHEZ et O. T. AVERY. *Jour. Exper. Med.*, **26**, 477 (1917).

(2) F. NEUFELD. *Ztschr. f. Hyg. u. Infekt.*, **40**, 54 (1902).

(3) A. WADSWORTH. *Jour. Med. Res.*, **10**, 228 (1903-1904).

(4) L. PANICHI. *Centr. f. Bakter., I. Abt. Orig.*, **43**, 188 (1907).

(5) O. T. AVERY, M. HEIDELBERGER, etc. *Jour. Exper. Med.*, **38** (1923); **39** (1924); **40** (1924); **42** (1925); **46** (1927); **49** (1929); **50** (1929); *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **26**, 482 (1929).

fois de plus l'hypothèse de LANDSTEINER, en montrant que les différences immunologiques reposent sur des différences chimiques.

Les recherches sérologiques concordent avec celles de ZINSSER. On retrouva les deux haptènes de ZINSSER, le « nucléoprotéide » et « l'antigène résiduel », qui fut identifiée à « la substance soluble spécifique ». Dans les infections pneumococciques le rôle des deux haptènes, de l'antigène résiduel et du nucléoprotéide, n'est cependant pas comparable.

Le nucléoprotéide est le même, tout au moins au point de vue sérologique, pour les trois types de pneumocoques. C'est un antigène vrai; on peut obtenir un sérum uniquement antiprotéidique en injectant au lapin par exemple une solution de pneumocoques dans la bile. Le sérum ainsi obtenu ne précipite qu'en présence du protéide et reste complètement indifférent en présence du polyholoside. Ce sérum est sans influence sur la culture et sur la virulence des pneumocoques.

« L'antigène résiduel » est un polyholoside, différent pour les trois types de pneumocoques. C'est un débris d'antigène, un haptène proprement dit, qui, pour pouvoir fonctionner comme un antigène vrai, doit être supporté par la charpente protéidique des cellules.

La virulence des pneumocoques paraît être liée étroitement à la présence de ces polyholosides. Le polyholoside spécifique serait contenu dans la couche superficielle, la capsule des pneumocoques; les pneumocoques dépourvus de capsule sont à la fois dépouillés de virulence et de polyholoside spécifique (formes R et S des pneumocoques). La destruction diastasique des polyholosides abolit la virulence des pneumocoques et leur effet vaccin (1). L'importance immunologique de ces polyholosides ressort également de nombreux autres faits: les polyholosides neutralisent l'effet protecteur des sérums antipneumococciques et l'effet empêchant des sérums spécifiques sur la culture des pneumocoques (2); ces substances annuleraient l'effet inhibant qu'exerce, sur la culture des pneumocoques, le mélange de leucocytes et de sérum d'animaux doués d'une résistance natu-

(1) AVERY et DUBOS. *Journ. Exp. Med.*, **54**, 73 (1931).

(2) O. T. AVERY et M. HEIDELBERGER. *Jour. Exper. Med.*, **42**, 367 (1925).

relle vis-à-vis des pneumocoques (1). Les polyholosides neutraliseraient *in vivo* l'effet protecteur des sérums antipneumococciques (2).

Il semble que l'immunité antipneumococcique s'identifie avec l'immunité antipolyholosidique. Si les sérums antiprotéidiques sont dépourvus de toute activité, par contre tous les sérums qui précipitent *in vitro*, en présence des polyholosides spécifiques, ont un pouvoir préventif et curatif dans les pneumococcies expérimentales. Cette activité des sérums est aussi spécifique que les polyholosides eux-mêmes : les sérums correspondant à l'un des types de pneumocoques n'exercent aucune action sur une infection correspondant à un autre type de pneumocoques.

Le polyholoside spécifique n'a pas de toxicité appréciable pour l'animal neuf et il se montre incapable de produire une sensibilisation active d'ordre anaphylactique : par contre il provoque un shock anaphylactique mortel chez l'animal sensibilisé d'une façon passive (injection préalable d'un sérum précipitant la polyholoside correspondant) et cette sensibilisation est rigoureusement spécifique pour les différents types de pneumocoques (3). Ce fait, retrouvé d'ailleurs pour les haptènes d'autres microbes (LANCEFIELD (4), TOMCSIK (5)), facilite la compréhension des syndromes infectieux causés par les pneumocoques, dans lesquels on fait intervenir des processus de sensibilisation vis-à-vis des principes microbiens.

Résumé et discussion.

Nous avons vu dans ce chapitre que les antigènes sont toujours des colloïdes biologiques, mais que certaines parties seulement de leurs micelles complexes constituent le support chimique de la spécificité antigénique. Nous avons ainsi défini des groupements chimiques actifs dans les micelles des antigènes et nous avons vu que ces groupements actifs sont fixés

(1) R. H. SIA. *Jour. Exp. Med.*, **43**, 633 (1926).

(2) FELTON et BAILY. *Jour. Inf. Dis.* (b) **38**, 145 (1926); (a) **48**, 131 (1926).

(3) O. T. AVERY et W. S. TILLET. *Jour. Exper. Med.*, **49**, 231 (1929).

(4) R. C. LANCEFIELD. *Jour. Exp. Med.*, **47**, 833 et 847 (1928).

(5) J. TOMCSIK et J. T. KUROTCHKIN. *Jour. Exp. Med.*, **47**, 379 (1928).

plus ou moins solidement à leur support complexe. Parfois des fragments du complexe antigénique entier peuvent en être détachés facilement, ces fragments constituent alors des haptènes; d'autres fois le complexe d'ensemble conserve d'une façon plus tenace ses groupements actifs; nous désignons dans ce cas l'antigène sous le nom d'antigène protéidique. Cette différence n'est cependant pas très importante, d'autant plus que, comme nous l'avons déjà remarqué, les protéides sont des substances excessivement complexes et les molécules d'oses ou de lipides supportées par ces complexes, peuvent contribuer tout aussi bien à la spécificité de l'antigène protéidique que les polypeptides proprement dits; ces glucides ou ces lipides peuvent, d'autre part, constituer des haptènes. Ces deux possibilités ne dépendent que de l'intimité des relations qui unissent ces oses ou ces lipides avec les autres molécules qui constituent les micelles protéidiques.

Nous arrivons ainsi à conclure qu'un antigène est toujours constitué de la même façon d'un (ou de plusieurs) groupement actif et d'un support colloïdal. Cette conception rapproche d'une façon frappante diastases et antigènes.

Les exemples de LANDSTEINER, comme l'exemple des haptènes des pneumocoques, semblent cependant prouver que les groupements actifs des antigènes ont des propriétés physico-chimiques différentes de celles des substances qui sont les supports immédiats des activités diastasiques. Les groupements chimiques introduits par LANDSTEINER étaient des acides organiques de caractère polaire marqué (*) et les haptènes des pneumocoques étaient aussi des polyholosides de caractère polaire (1); les diastases sont par contre, nous l'avons vu, des substances caractérisées par une indifférence polaire.

Toutefois, il ne faudrait pas considérer cette différence comme un cas typique d'une règle générale. En ce qui concerne les exemples de LANDSTEINER, les travaux récents, poursuivis dans cette voie, montrent que des groupements moins

(*) Entre les fonctions de la chimie organique les acides et les bases constituent les types des fonctions polaires, ce sont eux, en effet, qui ont véritablement des charges électriques.

(1) M. HEIDELBERGER et F. KENDALL. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 26, 482 (1929).

franchement polaires que les acides, peuvent aussi déterminer des spécificités antigéniques. Les sucres introduits dans les micelles protéidiques peuvent ainsi donner une nouvelle spécificité (1); mais même des groupements franchement apolaires, tels que des groupements méthyles, ou halogénures méthylène etc. (2), peuvent aussi influencer les aptitudes spécifiques des antigènes protéidiques.

L'exemple des pneumocoques paraît être d'autre part un cas relativement simple en immunologie. Le haptène pneumococcique s'est offert en quelque sorte aux recherches chimiques parce qu'il était particulièrement facile à isoler: ce haptène, de caractère polaire tranché, doit être cependant considéré comme un cas plutôt exceptionnel. De nombreuses infections sont dues, en effet, à des microbes pourvus de certains antigènes ayant d'autres caractères physiques et ces antigènes sont en général les plus importants dans les infections considérées. Les toxines sont par exemple des antigènes doués de caractères physiques remarquablement proches de ceux des diastases. Comme celles-ci, les toxines sont, en effet, des substances ayant une indifférence polaire et une grande adsorbabilité, et dans leur fractionnement, nous nous trouvons en présence des mêmes difficultés que dans le fractionnement des diastases. Si, au point de vue finaliste, les toxines microbiennes paraissent représenter les exemples les plus typiques des antigènes microbiens (les substances agressives, les substances d'attaque des microbes), ces principes constituent en réalité des antigènes plutôt exceptionnels; elles ne représentent pas, en tout cas, les antigènes cellulaires typiques des microbes.

Cependant, même pour les pneumocoques les polyholosides spécifiques sont loin d'être tout. Ils nous apparaissent, du point de vue biologique, comme les agressives des microbes qui permettent à ces derniers d'éviter la phagocytose (3) et les précipitines antipolyholosidiques seraient des opsonines qui exaltent la phagocytose des pneumocoques virulents (4). Les

(1) O. T. AVERY et W. F. GEBEL. *Jour. Exp. Med.*, **50**, 53 (1929).

(2) H. ERLÉNMEYER et E. BERGER. *Biochem. Ztschr.*, **252**, 22 (1932).

(3) SIA. *Jour. Exper. Med.*, **43**, 633 (1926); WARD. *Jour. Exper. Med.*, **51**, 675 (1930).

(4) WARD et ENDERS. *Jour. Exper. Med.*, **57**, 327 (1933); K. GOODNER et R. DUBOS. *Jour. Exper. Med.*, **56**, 521 (1932).

polyholosides spécifiques ne sont cependant pas antigènes et la substance antigène spécifique proprement dite des pneumocoques paraît être différente de ceux-là. L'antigène spécifique serait thermolabile et excessivement adsorbable, il ressemblerait ainsi aux diastases (1).

Toujours est-il que les relations entre la virulence des pneumocoques et la présence des polyholosides spécifiques paraissent bien établies. Par contre, en ce qui concerne l'immunité antipneumococcique, tout ne semble pas dépendre des anticorps antipolyholosidiques. JUNGBLUT (2), J. F. ENDERS (3) et HEIDELBERGER et KENDALL (4) trouvent dans les pneumocoques des hapènes spécifiques différents des polyholosides spécifiques. Les observations déjà anciennes de GAY et CHICKERING (5) et celles, plus récentes de A. B. SABIN (6) font supposer l'existence d'autres anticorps curateurs et préventifs des infections pneumococciques que les précipitines antipolyholosidiques. Les antigènes qui donnent naissance à ces anticorps, seraient peut-être des toxines qui se formeraient au cours de l'autolyse des pneumocoques (7) ou quand ils entrent en contact avec les tissus de leur hôte (8).

Les polyholosides pneumococciques sont plutôt des antigènes tout à fait particuliers et la plupart des antigènes des microbes pathogènes ont des propriétés physiques comparables à ceux des diastases. C'est ce que nous allons montrer par l'exemple des bacilles tuberculeux.

(1) H. A. DAY. *Brit. Jour. Exper. Path.*, 11, 164 (1930).

(2) JUNGBLUT. *Jour. Exper. Med.*, 45, 227 (1927).

(3) J. F. ENDERS. *Jour. Exper. Med.*, 52, 235 (1930).

(4) HEIDELBERGER et KENDALL. *Jour. Exper. Med.*, 53, 625 (1931).

(5) GAY et CHICKERING. *Jour. Exper. Med.*, 21, 389 (1915).

(6) A. B. SABIN. *Jour. Exper. Med.*, 53, 93 (1931); 56, 53 (1932); 57, 139 (1933).

(7) PARKER. *Jour. Exper. Med.*, 47 (1928); 49 (1929); 50 (1930).

(8) CURPHEY et BARUCH. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 26, 637 (1929); 28, 280 (1931); SABIN. *Jour. Exper. Med.*, 56, 531 (1932).

TROISIÈME PARTIE

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX PERSONNELS

(Propriétés physico-chimiques de quelques antigènes
des bacilles de Koch).

CHAPITRE PREMIER

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE L'INFECTION BACILLAIRE

Si l'infection pneumococcique expérimentale représente un cas relativement simple de l'immunologie, l'infection bacillaire par contre en est un des exemples les plus complexes.

Le pneumocoque est un microbe labile, l'infection qu'il provoque est généralement aiguë, brutale et de courte durée. Il contient un polyholoside spécifique qui paraît jouer un rôle très important dans les relations avec les organismes qu'il parasite ; ce polyholoside est un acide assez énergique, de caractères chimiques nets. Les sérums expérimentaux et les sérums des malades atteints de pneumococcies s'enrichissent d'anticorps bien caractérisés.

Le bacille de Kocа est un microbe stable ; l'infection tuberculeuse s'accompagne de symptômes atténués d'évolution lente ; sa durée est indéfinie.

La virulence des bacilles tuberculeux et l'immunité de l'organisme sont déterminés par des principes encore peu connus. Les substances qui semblent correspondre aux antigènes partiels ou aux haptènes des autres microbes sont, comme les diastases, des *corps fantômes* qui, doués d'une adsorbabilité extraordinaire et d'une activité énorme, ne paraissent pas avoir de propriétés physiques propres, mais épousent celles des substances contenues dans leur ambiance. De grandes difficultés s'opposent ainsi aux recherches expérimentales dans la tuberculose, d'autant plus que la teneur en anticorps des sérums tuberculeux est très variable et que ces anticorps ne sont pas rigoureusement spécifiques.

Caractères sérologiques et biologiques de l'infection bacillaire.

On admet généralement que deux caractères biologiques prédominent dans l'infection bacillaire : 1° du point de vue sérologique, l'existence prédominante d'anticorps lipodiques ; 2° du point de vue physio-pathologique, une hypersensibilité de caractères particuliers : l'allergie tuberculinique.

Le sérum des tuberculeux contient le plus souvent des anticorps. Ces anticorps sont peu spécifiques et réagissent parfois avec les antigènes employés pour la réaction de WASSERMANN et avec les extraits alcooliques de bacilles paratuberculeux, de bacilles diptériques et de bacilles lépreux (1). Certains auteurs nient l'existence d'anticorps vrais dans le sérum des tuberculeux et considèrent les réactions sérologiques de la tuberculose comme l'expression de changements physico-chimiques particuliers des humeurs, d'une labilité particulière des colloïdes sanguins (2). Cependant tous les auteurs sont d'accord en ce qui concerne l'existence, dans le sérum des tuberculeux, d'anticorps réagissant avec l'antigène contenu dans l'extrait lipodique du bacille de KOCH (K. MEYER (3), BOQUET et NÈGRE (4), M. PINNER (5), etc.). L'existence d'autres principes bacillaires qui seraient haptènes vis-à-vis des sérums de malades, est discutée et nous allons montrer plus loin les difficultés extraordinaires auxquelles on se heurte lorsqu'on veut déterminer la nature chimique exacte des haptènes bacillaires qui réagissent avec les anticorps contenus dans les sérums de tuberculeux. Ces difficultés n'étaient en général pas observées, ce qui explique les contradictions qui existent à ce sujet dans la littérature.

(1) BABÈS et BUSILA. *C. R. Soc. Biol.*, **83** (2 juillet 1910); BOQUET et NÈGRE. *Ann. Inst. Pasteur*, **37** (1923); BORDET et GENGOU. *C. R. Acad. des Sciences* (3 août 1903); MASSOL et GRYZEL. *C. R. Soc. Biol.* (25 juillet 1914); ROGERS. *Jour. Infect. Dis.* (27 avril 1920).

(2) DARANYI. *Beitr. Klin. Tbk.*, **69**, 558 (1928); MATEFY. *Med. Klin.*, **725** (1923); VERNES. *Arch. Inst. Prophyl.*, **2**, 213 (1930).

(3) K. MEYER. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, **7** (1910); **11** (1911); **14** (1912).

(4) BOQUET et NÈGRE. *Ann. Inst. Pasteur*, **35** (1921); **37** (1923).

(5) M. PINNER. *Ztschr. f. Tbk.*, **41**, 323 (1925); **44**, 49 (1926); *Beitr. z. Klin. d. Tbk.* **73**, 784 (1929).

Nos recherches personnelles, entreprises avec W. SCHAEFER (1), démontrent dans le sérum des tuberculeux des anticorps qui réagissent avec un antigène différent de l'antigène lipéidique. Nous allons appeler cet antigène l'*antigène protéidique* parce qu'il paraît accompagner les colloïdes complexes, produits par les bacilles au cours de leur développement; nous allons montrer cependant qu'il n'est pas le protéide bacillaire proprement dit.

L'allergie n'est pas spéciale à la tuberculose, elle s'observe dans un grand nombre d'infections microbiennes et en particulier dans les infections chroniques. La manifestation cutanée de cette allergie consiste en une réaction papuleuse ou nécrotique qui se développe, plusieurs heures après l'injection intradermique de traces infimes de filtrats de culture, chez les sujets infectés par des bacilles de KOCH (cuti-réaction de VON PIQUET, intradermo-réaction de C. MANTOUX (2)). Sauf dans quelques cas de maladies intercurrentes (anergie), cette sensibilité est constante au cours des infections tuberculeuses.

La réaction allergique paraît être provoquée, comme nous allons le montrer plus loin, par un principe tout à fait particulier. Nous appelons ce principe : « la tuberculine » et nous supposons que la « tuberculine » est un groupement chimique différent des autres antigènes bacillaires. Ce groupement chimique serait le support du pouvoir qu'ont certaines substances d'origine bacillaire de provoquer une réaction tuberculinique chez les individus sensibilisés.

L'antigène lipéidique, l'*antigène protéidique* et la *tuberculine* sont donc trois antigènes partiels des bacilles tuberculeux. Quel est le rôle biologique exact de chacun de ces antigènes dans l'infection bacillaire? c'est-à-dire quelles sont leurs relations avec la virulence des microbes et l'immunité des organismes? Si les travaux de BOQUET et NÈGRE semblent prouver que l'antigène lipéidique, ou plutôt les anticorps engendrés par lui, jouent un rôle dans l'immunité antituberculeuse, si, *a priori*, l'allergie tuberculinique pourrait aussi être un détec-

(1) W. SCHAEFER et G. SANDOR. *Annales de l'Institut Pasteur*. 53, 72 (1934).

(2) C. MANTOUX. *C. R. Acad. des Sciences*, 147, 355 (1908); 148, 996 (1909).

minant de cette immunité, ces relations biologiques sont encore foncièrement ignorées. La biologie de l'infection bacillaire est ainsi presque une page blanche dans l'histoire des maladies infectieuses.

L'antigène lipoidique, l'*antigène protéidique* et la *tuberculine* sont-ils tous les antigènes des bacilles tuberculeux ? Nous n'en savons pour le moment rien. De nombreux auteurs trouvent des polyholosides qui réagissent avec les sérums de tuberculeux. Cependant, nous allons montrer que les antigènes des bacilles tuberculeux sont des substances sans caractère physique tranché. L'antigène lipoidique est adsorbé tantôt par des protéides, tantôt par des polyholosides ou des graisses et il en est de même pour l'antigène que nous appelons protéidique et pour la *tuberculine*. Ce sont des substances actives à des doses infimes (au $1/10.000.000^e$ ou $1/100.000.000^e$ de gramme) qui épousent entièrement les propriétés de solubilité des substances indifférentes qui les accompagnent. Une chimie-physique particulière doit donc s'appliquer à leur étude qui doit recourir à des tests particuliers différents de ceux de la chimie-physique classique.

CHAPITRE II

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE LA TUBERCULINE (*)

Résumé historique.

Les tuberculines sont des substances d'origine bacillaire qui sont capables de provoquer des réactions générales ou locales après leur injection à des sujets tuberculeux à des doses qui sont complètement inopérantes chez des sujets non atteints de tuberculose (**). En ce qui concerne les caractères généraux des réactions tuberculiniques locales et générales, nous renvoyons aux traités classiques. Nous voudrions insister seulement sur la lenteur des réactions tuberculiniques : celles-ci se font en effet toujours après une incubation de plusieurs heures et se distinguent ainsi nettement des réactions anaphylactiques, toujours immédiates.

La nature chimique de la substance qui provoque les réactions allergiques chez les sujets tuberculeux, a été très controversée. La plupart des auteurs ont admis qu'elle correspond à un polypeptide ou à une albumose (1). D'autres, se fondant sur les résultats de recherches chimiques et sur des essais de sensibilisation des animaux, pensent que la sensibilisation du type tuberculinique serait différente de la sensibilisation anaphylac-

(*) Cette partie du travail fut effectuée en collaboration avec A. BOQUET.

(**) Cette définition des *tuberculines* n'est pas tout à fait complète. Les bacilles morts sont, en effet, aussi capables de sensibiliser à la tuberculine.

(1) R. KOCH. *Dtsch. med. Wchschr.*, 67, 1189 (1891); E. LÆWENSTEIN et E. P. PICK. *Biochem. Ztschr.*, 31, 142 (1911).

tique aux protéides (1). Leurs expériences semblaient démontrer que la réaction tuberculinique, exemple typique des réactions allergiques en général, occupe une place spéciale dans le domaine de la biologie. La réaction tuberculinique évoluerait en effet d'une façon autre que la réaction anaphylactique ; elle résulterait de l'intervention d'une substance spéciale, distincte des protéides bacillaires banaux qui eux provoqueraient la réaction anaphylactique.

E. R. LONG, en collaboration avec FL. B. SEIBERT, reprend l'étude chimique et biologique de la tuberculine et démontre que des relations étroites unissent l'activité tuberculinique aux protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles de Koch. Toute préparation active contiendrait des protéides (2) ; les différents agents précipitants n'épuiserait l'activité tuberculinique des préparations qu'autant qu'ils précipitent la totalité des protéides (3) et l'activité tuberculinique ne serait détruite que par les protéases qui agissent sur les protéides complets (4) (pepsine, trypsine). LONG tend à en inférer que la tuberculine est identique aux protéides bacillaires, cependant il n'exclut pas l'hypothèse de l'existence d'une substance tuberculinique active supportée par les protéides (5).

SEIBERT continua seule ces travaux, commencés en collaboration avec LONG. Après de longues années de travail sur un matériel énorme, elle réussit à obtenir un protéide cristallisé très actif du point de vue tuberculinique (6). Ce protéide conserve son activité après plusieurs cristallisations successives, sa dénaturation et son inactivation iraient parallèlement.

L'injection répétée du protéide tuberculinique provoquerait chez les cobayes une sensibilisation de la peau comparable à celle des animaux tuberculeux. L'activité sensibilisante et l'activité tuberculinique de ce produit seraient parallèles (7).

(1) BALDWIN. *Jour. Med. Res.*, 22, 489 (1910) ; KRAUSE. *Amer. Rev. Tbc.*, 1, 65 (1917-1918) ; SELTER. *Ztschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 32, 325 (1921) ; ZINSSER. *Jour. Exper. Med.*, 34, 495 (1921).

(2) E. R. LONG et FL. B. SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, 13, 393 (1926).

(3) E. R. LONG et FL. B. SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, 13, 398 et 408 (1926).

(4) FL. B. SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, 13, 431 (1926).

(5) E. R. LONG et FL. B. SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, 13, 448 (1926).

(6) FL. B. SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, 17, 402 (1928).

(7) FL. B. SEIBERT. *Jour. of Inf. Dis.*, 51, 383 (1932).

SEIBERT conclut que la tuberculine est identique aux protéides bacillaires et que l'allergie ne serait qu'un cas particulier de la sensibilisation du type anaphylactique.

RECHERCHES PERSONNELLES

Relations entre le protéide tuberculinique et l'activité tuberculinique.

Les résultats des expériences de F. SEIBERT sont très intéressants, mais, si nous examinons les arguments qu'elle présente en faveur de sa théorie, nous devons conclure que sa conclusion n'est pas tout à fait fondée. Actuellement nous savons que les protéides sont constitués par des micelles colloïdales très complexes contenant de nombreuses espèces chimiques différentes. Les relations entre celles-ci peuvent être très étroites ; elles peuvent permettre en particulier la cristallisation du complexe d'ensemble, mais les constituants des cristaux complexes des protéides peuvent quand même exister isolément ou être fixés à un autre complexe (1). En nous basant sur ces considérations générales, nous avons repris les expériences de SEIBERT et nous avons trouvé que la tuberculine n'est certainement pas identique à tous les protéides bacillaires, ces protéides peuvent être son support et en contenir des quantités variables. La nature chimique de la tuberculine est inconnue ; il n'est pas impossible qu'elle soit un protéide ou un protide plus simple, mais dans ce cas le « protéide tuberculinique » proprement dit, devrait être différent des autres protéides banaux des bacilles. La tuberculine est, en tout cas, une substance excessivement adsorbable, dont l'activité allergique paraît pouvoir disparaître assez facilement sous des influences encore imprécises. L'histoire physico-chimique de la tuberculine est donc pleine d'inconséquences. Avant de l'aborder, nous allons décrire nos expériences biologiques.

(1) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. Laboratoire Carlsberg*, 18, 6 (1930).

Relations entre l'anaphylaxie aux protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles de Koch et l'allergie tuberculeuse.

Nous avons sensibilisé des cobayes par des injections sous-cutanées ou intrapéritonéales du filtrat du milieu de culture complet des bacilles tuberculeux et de plusieurs préparations protéidiques différentes, obtenues à partir de ce milieu de culture. Nous n'avons jamais pu obtenir une sensibilisation du type allergique de la peau de ces cobayes. Les protéides, contenus dans le milieu de culture non chauffé des bacilles, ont toujours provoqué une sensibilisation du type anaphylactique différant nettement de la sensibilisation du type allergique de la peau des cobayes tuberculeux. Ces réactions n'étaient provoquées que par l'injection intradermique des protéides homologues et la tuberculine brute ne donnait en général pas de réaction chez ces cobayes. Les caractères de ces réactions anaphylactiques (précocité, tendance hémorragique) étaient, d'autre part, foncièrement différents de ceux des réactions allergiques (réactions tardives, tendance papuleuse ou nécrotique).

Les animaux sensibilisés avec deux préparations particulières ont parfois réagi à l'injection intradermique de la tuberculine brute. Ces deux préparations étaient : le filtrat de bouillon de culture et le précipité trichloracétique de ce bouillon de culture. Cependant, les réactions étaient dans ce cas aussi du type anaphylactique (1).

Description des expériences.

Nous avons employé les préparations suivantes :

1° *Le précipité obtenu à partir du filtrat du milieu de culture des bacilles tuberculeux par le sulfate d'ammonium à saturation.* Le milieu de culture synthétique (SAUTON) sur lequel

(1) Voir A. BOQUET et G. SANDOR. *C. R. Soc. de Biol.* **14**, 434 (1934).

des bacilles tuberculeux (souche humaine RATI ou souche bovine VALLÉE) ont cultivé pendant 6 semaines, fut filtré sur filtre d'amiante (filtre de SEITZ) sans chauffage ou autre stérilisation préalable, puis il fut saturé par du sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu fut centrifugé, dissous dans l'eau et dialysé dans des sacs de collodion contre l'eau courante puis contre l'eau distillée. Le contenu des sacs fut prélevé, puis desséché dans le vide sulfurique (*). Nous avons injecté sous la peau de plusieurs lots de cobayes, 6 fois de suite, 10 milligrammes de ce précipité à 3 jours d'intervalle.

2° *Le précipité précédent chauffé à 120° pendant 20 minutes.* La poudre protéidique, obtenue comme il est indiqué ci-dessus fut dissoute dans l'eau, chauffée à 120°. Dans la solution nous avons dissous 9 p. 1.000 de chlorure de sodium, puis nous avons séparé la fraction coagulée (en général 1/3 du poids total des protéides) par centrifugation. La sensibilisation des cobayes fut entreprise exactement comme pour la première préparation.

3° *Le précipité trichloracétique du filtrat du milieu de culture synthétique.* Au filtrat nous avons ajouté 8 p. 100 d'acide trichloracétique. Le précipité fut séparé par centrifugation, dissous dans l'eau à la neutralité et précipité à nouveau par de l'acide trichloracétique. Le précipité final fut lavé par un excès d'éther, puis séché dans le vide sulfurique (tuberculine trichloracétique de SEIBERT). La préparation des cobayes fut effectuée comme précédemment.

4° *Le filtrat complet du bouillon de culture.* Le bouillon peptoné et glyciné, sur lequel des bacilles tuberculeux (souche bovine VALLÉE) avaient cultivé pendant 6 semaines, fut filtré sur bougie de CHAMBERLAND L2. Dans le filtrat nous avons dissous 5 p. 1.000 d'acide phénique. 5 à 10 cm³ de ce filtrat furent injectés dans le péritoine de plusieurs lots de cobayes, 6 fois de suite à 3 jours d'intervalle.

5° *Le précipité trichloracétique du filtrat du bouillon de culture.* Dans le filtrat nous avons dissous 8 p. 100 d'acide trichloracétique. Le précipité fut séparé par centrifugation, dis-

(*) Le précipité était constitué par un protéide complexe. La constitution chimique de ce dernier sera indiquée plus loin.

sous dans l'eau à la neutralité et précipité par l'acide trichloracétique ; cette opération fut répétée encore 3 fois et le précipité final dissous dans l'eau à la neutralité. Nous avons dissous dans la solution 5 p. 1.000 d'acide phénique comme antiseptique, puis nous avons déterminé sa teneur en protéides par un dosage d'azote. La préparation des cobayes fut ensuite effectuée comme dans les autres cas (6 injections sous-cutanées à 3 jours d'intervalle d'un volume contenant 10 milligrammes de protéides) (*).

Tous les 8 jours, à partir de la dernière injection préparante, nous avons injecté dans le derme des cobayes : a) $1/10^e$ de cm^3 d'une solution à 5 p. 1.000 du précipité par le sulfate d'ammonium à saturation ; b) $1/10^e$ de cm^3 de tuberculine brute au $1/10^e$ et parfois c) $1/10$ de cm^3 d'une solution à 5 p. 1.000 des protéides chauffés à 120° . Nous avons observé la sensibilité de nos cobayes pendant 2 à 3 mois, au bout de ce temps les animaux furent sacrifiés. Aucun ne fut trouvé atteint de tuberculose.

Résultats obtenus.

Les animaux sensibilisés par toutes les préparations ont, en général, réagi, à partir du 15^e ou 21^e jour après la dernière injection préparante, à l'injection intradermique des protéides bacillaires non chauffés (préparation n° 1). Le nombre des cas positifs et l'intensité des réactions furent cependant très variables d'une préparation à la suivante. Le meilleur antigène préparant était le protéide complet (préparation n° 1) qui donnait 80 à 90 p. 100 de cas positifs et les réactions obtenues étaient en général très intenses. Les plus mauvais antigènes préparants étaient le précipité trichloracétique du filtrat du milieu de SAUTON (préparation n° 3) et les protéides chauffés à 120° ; ces préparations ne donnaient que 15 à 20 p. 100 de cas positifs et l'intensité des réactions était toujours très faible. Les protéides chauffés n'ont fait réagir, en général, que les animaux préparés avec les protéides non chauffés et les réactions étaient toujours très faibles.

A peu près 30 p. 100 des cobayes, préparés avec le précipité

(*) Pour avoir la teneur en protéides, nous avons multiplié le taux d'azote par 7.

trichloracétique du bouillon de culture (préparation n° 5) et le filtrat complet du bouillon de culture, ont réagi 3 à 4 semaines après la dernière injection préparante à l'injection intradermique de la tuberculine brute. Les animaux injectés avec les autres préparations n'ont jamais réagi à la tuberculine brute.

Toutes les réactions observées avaient les mêmes caractères. A peu près une heure après l'injection intradermique, une tache purpurique pâle est apparue à l'endroit de l'injection. Celle-là augmentait d'intensité dans les heures suivantes et, au bout de 4 à 5 heures, la peau était soulevée par un œdème très étendu, dont le centre portait une tache purpurique foncée, mal délimitée, du diamètre d'une pièce de 50 centimes environ. Au bout de 24 heures, l'intensité de la réaction persistait et souvent son centre présentait une nécrose limitée. Cette réaction diffère fondamentalement de la réaction tuberculinique qui ne débute que 5 ou 6 heures après l'injection et qui prend la forme d'une papule bien délimitée, hémorragique ou nécrotique. A la concentration employée, les protéïdes ne provoquaient chez les cobayes normaux que, parfois, une légère rougeur avec un œdème peu étendu.

Dans le tableau ci-après nous réunissons l'essentiel de nos résultats. Nous avons indiqué dans une troisième colonne, l'activité tuberculinique comparée de nos préparations; la signification de ces résultats sera précisée dans le chapitre qui suit.

TABLEAU I

	Activité réactionnelle chez les animaux sensibilisés avec les protéïdes	Activité réactionnelle chez les animaux tuberculeux	Activité sensibilisante
Précipité par le sulfate d'ammonium du filtrat de SAUTON	++++	+	++++
Précipité trichloracétique du filtrat de SAUTON . .	+	+++	+
Filtrat du bouillon . . .	---	++++	++
Précipité trichloracétique du filtrat de bouillon . .	---	+++	++
Protéïdes chauffés . . .	+ ?	+	+ ?
Tuberculine brute. . . .	0	++++	0

Discussion des résultats.

Les résultats de ces expériences montrent qu'il y a une différence fondamentale entre l'anaphylaxie aux protéides bacillaire et l'allergie tuberculinique. Les caractères biologiques des deux réactions, comme les substances qui les provoquent, sont différents.

Les animaux préparés avec les protéides bacillaires n'ont pas réagi avec la tuberculine brute, ils ont par contre très bien réagi à l'injection de protéides homologues. En ce qui concerne les animaux tuberculeux, c'est juste l'inverse qui se produit; ils réagissent de préférence avec la tuberculine brute. Une dilution au 1/1.000^e de cette dernière donnera par exemple encore une belle papule chez des cobayes tuberculeux qui ne réagiront plus ou presque plus à une dilution au 1/100^e de notre solution protéidique (*).

La différence apparaît encore entre la substance qui intervient dans l'anaphylaxie et la tuberculine lorsqu'on observe l'influence de la chaleur et de l'acide trichloracétique. Le précipité trichloracétique du filtrat du milieu de Sauton est en effet une bonne tuberculine, mais il prépare très mal les animaux à une réaction anaphylactique et il ne fait réagir que très mal les animaux anaphylactiques. La chaleur qui n'a, comme nous savons, qu'une action relativement faible sur la tuberculine, détruit presque complètement la qualité anaphylactogène des protéides.

Nous n'avons jamais pu obtenir une sensibilisation du type allergique. Il est difficile de juger la signification exacte de ce fait parce que les conditions physiologiques (le terrain) peuvent éventuellement avoir une influence sur les types des réactions intradermiques (DIENES (1)). Cependant nous n'avons pu sensibiliser la peau des cobayes qu'avec certaines préparations, et même avec celles-ci d'une façon fort inconstante, aux principes réactionnels contenus dans la tuberculine brute. Il en faut conclure que l'antigène qui prépare aux réactions anaphylactiques, est différent de celui qui prépare à la réaction tuber-

(*) Voir chapitre suivant.

(1) L. DIENES et collaborateurs. *Journ. of Immun.*, **15**, 453 (1928); **20**, 221, 333 (1931). *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.*, **28**, 75 (1930).

culinique. Ce dernier antigène serait d'autre part très labile et différent de la tuberculine proprement dite parce que des bonnes tuberculines, comme la tuberculine brute ou le précipité trichloracétique du filtrat du milieu de Sauton, sont complètement incapables de sensibiliser d'une façon active à la tuberculine (*).

La meilleure explication de ces faits nous donnera une sorte de plan d'orientation pour nos recherches ultérieures. Le milieu de culture complet des bacilles tuberculeux contiendrait au moins trois principes différents : 1° l'antigène protéidique, substance conférant l'anaphylaxie et capable de provoquer des réactions anaphylactiques chez les animaux sensibilisés ; 2° la tuberculine, substance ou groupement chimique provoquant des réactions allergiques chez les individus tuberculeux et 3° l'antigène tuberculinique, principe très labile qui sensibiliserait d'une façon active à la tuberculine. Cependant rien ne prouve que les trois principes soient supportés par trois substances différentes, ils pourraient très bien être trois qualités physiques ou chimiques d'une même substance complexe : le protéide tuberculinique. Voyons quelles conclusions on peut tirer de l'étude des relations physico-chimiques qui existent entre les protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles et la tuberculine.

Relations physico-chimiques entre les protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles tuberculeux et la tuberculine.

De grandes difficultés entourent l'étude physico-chimique de la tuberculine ; celle-ci est en effet un principe assez labile et, d'autre part, il n'y a pas de méthode quantitative proprement dite pour son dosage. La tuberculine n'est pas un haptène dans le sens sérologique du mot et les deux tests qui seuls peuvent servir à la caractériser, sont la réaction intradermique et le

(*) Il est intéressant de rappeler à cet endroit (voir p. 40) que des antigènes incomplets, les haptènes de LANDSTEINER, sont capables de provoquer des réactions anaphylactiques. La tuberculine pourrait ainsi être un haptène réactionnel, capable de provoquer des réactions chez des individus sensibilisés, mais incapable de sensibiliser d'une façon active.

shock tuberculinique chez les cobayes tuberculeux. Cependant, la sensibilité des animaux est extrêmement variable et les deux tests sont également imparfaits du point de vue quantitatif.

L'autre difficulté réside dans la labilité de l'activité tuberculinique. Les conditions de destruction de la tuberculine ne sont pas encore assez précises et nous avons souvent trouvé que les mêmes préparations étaient tantôt actives et tantôt inactives (*). Il semble que la tuberculine soit en général assez stable dans les corps bacillaires et dans les milieux de culture intacts et non infectés de bacilles tandis qu'elle tend à disparaître assez rapidement dans les fractions obtenues à partir de ces matériaux primitifs. Ainsi, jusqu'à présent, nous n'avons pu trouver aucune fraction dont l'activité aurait été assez constante et régulière et qui, de ce fait, aurait pu remplacer la pratique des tuberculines constituées par les milieux de culture complets.

Pour déterminer quelles sont les relations entre les protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles et la tuberculine, nous avons étudié l'influence sur l'activité tuberculinique de la dialyse, de la dénaturation des protéides et de la précipitation fractionnée du milieu de culture. Nous avons effectué un très grand nombre d'expériences et nous espérons ainsi pouvoir fournir des résultats vraiment constants et toujours identiques à eux-mêmes. Les résultats contradictoires sont, en effet, excessivement fréquents dans l'étude de la tuberculine.

Description des expériences. Dialyse.

La dialyse constitue en général une phase importante dans le fractionnement et la purification des principes biologiques qui sont le plus souvent des colloïdes complexes. Ce fait nous a amené à étudier d'une façon approfondie l'influence de la dialyse sur la tuberculine.

(*) Ces inactivations ne semblent pas dépendre des variations faibles du pH que peut subir un milieu non tamponné. Dans nos expériences nous avons vu que les tuberculines conservées pendant plusieurs semaines dans des milieux tampons de pH variables, entre 3.6 et 8.5 n'ont pas subi de changements sensibles de leur activité.

De nombreux auteurs ont contribué à l'étude de ce sujet et leurs résultats ne sont pas du tout concordants. Certains trouvent que la tuberculine dialyse (1), d'autres qu'elle ne dialyse pas (2). SEIBERT reprend ces expériences de dialyse sur une grande échelle; dans une première série d'essais, cet auteur trouve aussi des résultats contradictoires (3) (4). Cependant elle constate finalement que l'activité tuberculinique ne traverse jamais les membranes de dialyseur préparées à partir d'une solution de collodion acétique à 15 p. 100 (5). La plus petite particule pouvant être le support de l'activité tuberculinique aurait ainsi un poids moléculaire d'au moins 2.500.

Nous avons effectué un grand nombre d'expériences avec le filtrat du milieu de culture synthétique (SAUTON) non chauffé, avec la tuberculine brute et avec le précipité protéidique du filtrat de milieu de culture. Dans toutes nos expériences nous avons employé des sacs de dialyseur préparés à partir d'une solution de coton-poudre à 5 p. 100 dans l'alcool et l'éther à parties égales. Nous n'avons donc pas vérifié les expériences de SEIBERT proprement dites parce que nous n'avons pas pu nous procurer du collodion acétique de concentration variable, mais nos dialyseurs correspondaient bien à la définition classique; en effet, ils ne se laissaient jamais traverser par une solution aqueuse de rouge Congo, donc ils étaient imperméables pour les protéides (ZSIGMONDY) (*).

Protocoles expérimentaux.

Dans une première série nous avons dialysé le filtrat du milieu de culture synthétique, la tuberculine brute ou les protéides précipités par le sulfate d'ammonium à saturation, con-

(1) ZIELER. *Muench. med. Wochschr.*, **55**, 1685 (1908); DANIELOPOLU, *C. R. Soc. Biol.*, **66**, 334 (1909); LÆWENSTEIN et PICK. *Centralbl. f. Bakter.*, Orig., **68**, 592 (1913); ZINSSER. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **18**, 123 (1921).

(2) MARIE et TIFFENEAU, *C. R. Soc. Biol.*, **66**, 206 (1909); SELTER et TANRÉ. *Beitr. z. Klin. d. Tbk.*, **53**, 82 (1922).

(3) et (4) SEIBERT et LONG. *Amer. Rev. Tbc.*, **13**, 404 et 408 (1926).

(5) SEIBERT et MUNDAY. *Amer. Rev. Tbc.*, **23**, 23 (1931).

(*) Dans nos expériences de dialyse il fallait éviter l'endosmose parfois très forte. Nous nous sommes servi de petits appareils en verre qui permettent de dialyser sous une pression de mercure.

tre un volume connu d'une solution aqueuse contenant 5 p. 1.000 d'acide phénique et 7 p. 1.000 de chlorure de sodium. La dialyse fut arrêtée au bout de 3 à 8 jours et nous avons comparé l'activité du contenu des dialyseurs et des dialysats à celle des mêmes préparations non dialysées (*). Les dialysats du milieu de culture synthétique non chauffé et de la tuberculine brute, étaient toujours actifs et l'inactivation de ces préparations par la dialyse n'était pas sensible. Le dialysat des protéides tuberculiniques (**) était parfois actif et d'autres fois inactif; nous ne pouvons pas encore préciser la raison de ces différences. Des différences existaient aussi dans l'inactivation des protéides pendant la dialyse; elle était parfois presque insensible et dans d'autres cas très marquée. Ci-après nous reproduisons le protocole d'une de nos expériences :

Nous avons dialysé : a) 20 cm³ de tuberculine brute contre 60 cm³ d'eau physiologique phéniquée. Le pigment rouge-brun traverse le dialyseur et le dialysat devient presque aussi coloré que le contenu des sacs de collodion. Ce dernier devient louche au bout de 2 à 3 jours de dialyse et un précipité fin apparaît. Au bout de 8 jours nous avons mesuré le volume du contenu du sac de collodion et celui du dialysat et nous avons ajusté la concentration des deux liquides au 1/4 de la tuberculine brute primitive. Nous avons enfin injecté dans le derme de 3 cobayes tuberculeux 1/10^e de cm³ de dilutions de la tuberculine brute non dialysée au 1/40^e, au 1/400^e et au 1/4000^e et des dilutions du dialysat, comme de la tuberculine brute dialysée au 1/10^e, au 1/100^e et au 1/1000^e (voir tableau n° II).

b) Nous avons dissous 400 milligrammes d'acide phénique dans 100 cm³ d'un filtrat du milieu de culture synthétique (SAUTON) non chauffé du bacille de KOCH (souche bovine VALLEE; la culture était âgée de 6 semaines et le filtrat avait un pH

(*) Nous avons toujours déterminé l'activité des préparations en les injectant à des dilutions augmentant en progression géométrique de l'ordre 10 (au 1/10^e, au 1/100^e, etc.), dans le derme de 3 à 4 cobayes tuberculeux. Nous avons considéré comme réaction tuberculinique positive, la présence d'une papule à l'endroit de l'injection, au bout de 24 heures.

(**) Le terme « protéides tuberculiniques », rappelle l'origine de ces protéides, étant donné qu'ils étaient contenus dans le milieu de culture des bacilles et que ce dernier est en général désigné par le terme commun de « tuberculine ».

de 6) et nous les avons dialysé pendant 5 jours contre 200 cm³ d'eau physiologique phénolée. Le pigment jaune traverse le dialyseur et le contenu du sac de collodion devient trouble. Au

TABLEAU II

Dialyse de la tuberculine brute.

Réactions intradermiques observées aux différentes dilutions.

	1/40	1/400	1/4.000
Dialysat	++	+ ?	0
Tuberculine brute non dialysée	+++	++	+
Tuberculine brute dialysée	+++	++	+
Signification des signes : + ? = réaction douteuse (épaississement, rougeurs); + = petite papule, ++ = papule nette, +++ = papule hémorragique; ++++ = papule nécrotique.			

bout de 5 jours nous avons mesuré le volume du dialysat et celui du contenu des dialyseurs et nous les avons complété au 1/3 de la concentration du filtrat primitif. Nous avons enfin injecté dans le derme de 4 cobayes tuberculeux 1/10^e de cm³ des dilutions du milieu de culture non dialysé au 1/3, au 1/30^e et au 1/300^e et le dialysat, comme le milieu de culture dialysé pur, au 1/10^e et au 1/100^e (voir tableau n° III).

TABLEAU III

Dialyse du milieu de culture synthétique.

Réactions intradermiques observées aux différentes dilutions.

	1/3	1/30	1/300
Dialysat	++	+	0
Sauton dialysé	+++	++	0
Sauton non dialysé . . .	+++	++	+

c) Nous avons saturé 1 litre d'un filtrat de SAUTON non chauffé (souche bovine VALLÉE, culture de 6 semaines) avec du sulfate d'ammonium. Le précipité fut séparé par centrifugation, puis dissout dans l'eau et la solution complétée à 13 cm³ (*); dans 2 cm³ de celle-ci nous avons mis un cristal de thymol et nous avons dialysé le reste contre 39 cm³ d'eau physiologique phénolée pendant 4 jours, puis nous avons mesuré le volume du dialysat et celui du contenu du dialyseur et nous les avons complétés à 52 cm³. Ces solutions furent injectées dans le derme de 3 cobayes tuberculeux à des dilutions variables, simultanément avec des dilutions variables des protéides non dialysés, dilués au 1/4.

TABLEAU IV

*Dialyse des protéides tuberculiniques.**Réactions intradermiques observées aux différentes dilutions.*

	1/10	1/100	1/1.000
Protéides non dialysés .	+++	++	+
Protéides dialysés . . .	+	+?	0
Dialysat	+?	0	0
Pour la signification des signes voir tableau n° II.			

Dans l'exemple choisi les protéides étaient donc fortement inactivés par la dialyse et leur dialysat était inactif. Dans d'autres cas cependant le dialysat était actif et l'inactivation des protéides par la dialyse était peu sensible. Remarquons toutefois que pour apprécier une différence sensible entre deux préparations par notre méthode, l'une doit être au moins trois fois plus active que l'autre.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons dialysé les protéides précipités par le sulfate d'ammonium à saturation pendant plusieurs jours contre un excès d'eau distillée changée

(*) Une fraction des protéides du milieu de culture est rendue définitivement insoluble par le sulfate d'ammonium. Dans l'expérience en question, nous avons mis en suspension la fraction insoluble et traité l'ensemble.

5 à 6 fois (*), en gardant comme témoin une fraction de ces mêmes protéides non dialysés en présence d'un cristal de thymol. Dans une partie de ces derniers nous avons dosé les protéides précipitables par l'acide trichloracétique en dissolvant dans la solution 8 p. 100 d'acide trichloracétique et en lavant le précipité 4 fois de suite avec de l'acide trichloracétique à 8 p. 100, puis en effectuant un microdosage d'azote (micro-Kjeldahl selon PARNASS et WAGNER) sur le précipité lavé. Les dialysats réunis (6 à 8 litres) furent évaporés presque complètement dans le vide à basse température (vers 30°). Nous avons mesuré le volume des protéides dialysés (contenus des dialyseurs) et sur une fraction connue, nous avons fait un dosage de protéides précipitables par l'acide trichloracétique suivant la méthode que nous avons indiqué ci-dessus. Nous avons enfin complété les protéides dialysés, les protéides non dialysés et le dialysat à une même dilution finale par rapport au filtrat de Sauton primitif et nous avons déterminé l'activité tuberculinique des trois préparations.

Les protéides étaient le plus souvent peu actifs déjà avant la dialyse et, en tout cas, l'activité tuberculinique du précipité par le sulfate d'ammonium ne représentait qu'une fraction faible de l'activité totale des filtrats. Les protéides restant après la dialyse étaient toujours peu actifs, les préparations actives s'inactivaient donc toujours pendant la dialyse. Les dialysats étaient, comme dans les expériences précédentes, tantôt actifs et tantôt inactifs. 15 p. 100 à peu près des protéides totaux précipitables par l'acide trichloracétique traversaient les dialyseurs, cette dialyse partielle ne pouvait donc pas rendre compte de l'inactivation parfois très prononcée des préparations. Les protéides provoquaient d'autre part, en général, des réactions précoces chez les cobayes tuberculeux. Ces réactions étaient diffuses et de tendance hémorragique, comme des réactions anaphylactiques classiques.

Les résultats de l'une de nos expériences sont reproduits dans le tableau ci-après (tableau n° V).

(*) Dans ces expériences nous avons éliminé la fraction insoluble des protéides. Les protéides restant ne subissent pas de changement visible dans leur dispersion pendant la dialyse.

TABLEAU V

Dialyse des protéides tuberculiniques.

	Concentration p. 100 en azote protéidique	Dilution maxima active
Protéides avant dialyse	0,17	1/100 +
Protéides après dialyse	0,15	1/100 + ?
Dialysat		1/100 +
Aux concentrations plus élevées les protéides provoquaient des taches pur-puriques diffuses et précoces.		

Résumé et rappel des conclusions.

La tuberculine traverse donc toujours les membranes imperméables pour les protéides classiques. Malgré que cette dialyse ne soit en général que partielle et que le dialysat perde souvent son activité, il est vraisemblable que la tuberculine est une substance relativement simple qui n'est retenue par les protéides proprement dits que par adsorption (*). Cette hypothèse explique les nombreuses contradictions que présentent les expériences de dialyse. Les phénomènes d'adsorption peuvent, en effet, changer par des raisons incontrôlables, par exemple à la suite des modifications de surface que peut subir un système en dispersion métastable. Un autre fait plaide encore en faveur de cette hypothèse. C'est que quand le dialysat était actif, la dose minima active d'azote était toujours bien plus faible dans celui-ci que dans la fraction non dialysable. En se rapportant à l'activité supportée par l'unité de poids

(*) Les protéides bacillaires qui ne dialysent pas, n'ont qu'une très faible activité tuberculinique et les réactions intradermiques qu'ils provoquent chez les cobayes tuberculeux, sont, en général, du type anaphylactique. Nous avons d'ailleurs vu dans le chapitre précédent, que ces protéides préparent les cobayes normaux à une réaction anaphylactique.

d'azote, l'azote dialysable était 3 à 10 fois plus actif que l'azote non dialysable. La perte fréquente de l'activité pendant la dialyse pourrait enfin être due au passage de la tuberculine dans le dialysat, où celle-là ne subit plus l'influence protectrice des colloïdes complexes.

Comme conclusion pratique, nous jugeons comme très dangereux toute dialyse ou ultrafiltration au cours de la préparation d'une tuberculine. Les phénomènes d'adsorption étant, en effet, excessivement variables, la valeur tuberculinique des préparations obtenues par dialyse ou ultrafiltration ne pourrait pas être constante.

Relations entre la dénaturation des protéïdes tuberculiniques et leur activité tuberculinique.

Nous avons déjà vu qu'au cours de la précipitation du filtrat du milieu de culture synthétique par le sulfate d'ammonium à saturation, il se forme toujours une fraction protéïdique dénaturée. Celle-ci est insoluble dans tous les solvants et se sépare des protéïdes non dénaturés, lors de leur reprise par de l'eau distillée, en filaments sales, d'aspect fibrineux.

SEIBERT a déjà constaté la formation de ces protéïdes dénaturés (1) ; cet auteur pense que ceux-ci prennent naissance au cours de la dialyse. Cependant, nous avons pu constater que la dénaturation de ces protéïdes ne dépend que de la précipitation par le sulfate d'ammonium. En effet, les protéïdes précipités, débarrassés de cette fraction insoluble dans l'eau distillée, sont très stables et ne précipitent pas pendant la dialyse. D'autre part, la dénaturation se produit en présence de sulfate d'ammonium en un milieu légèrement acide, comme à la neutralité ; celle-là est donc indépendante de la réaction du milieu (*).

Si les protéïdes tuberculiniques représentaient réellement la substance active tuberculinique, on devrait trouver que ces

(1) SEIBERT et LONG. *Amer. Rev. Tbc.*, **13**, 404 (1926).

(*) Ces protéïdes insolubles qui doivent prendre naissance d'une fraction protéïdique excessivement labile, ressemblent à ce qu'OSBORNE a appelé : les protéanes (*The Vegetable Proteins*, édit. : Longmans, Green and Co., New-York, 1916) ; la formation de celles-ci dépendrait cependant, d'après cet auteur, de l'acidité du milieu.

protéides complètement dénaturés ne sont plus actifs du point de vue tuberculinique. Ce n'est cependant pas le cas. Les protéides dénaturés, lavés à plusieurs reprises avec de l'eau distillée, produisent encore des réactions tuberculiniques énergiques. Le dosage de leur activité tuberculinique est naturellement impossible, vu leur insolubilité complète, quelques parcelles de ces filaments fibrinoïdes provoquent cependant une papule hémorragique ou même nécrotique.

Nous avons mentionné déjà précédemment la différence qui existe entre l'activité tuberculinique des protéides précipités par l'acide trichloracétique et ceux précipités par le sulfate d'ammonium, si ces derniers furent dialysés et séchés. Nous avons préparé les protéides précipités par l'acide trichloracétique d'après SEIBERT (1). Nous avons dissout dans le filtrat de Sauton 8 p. 100 d'acide trichloracétique, le précipité fut lavé deux fois avec de l'acide trichloracétique à 8 p. 100, puis avec un excès d'éther, il fut enfin séché dans le vide sulfurique. La poudre blanche ainsi obtenue ne donnait qu'une solution louche même en présence d'un excès d'alcali et précipitait à la neutralité. Les protéides étaient donc fortement dénaturés, cependant leur activité tuberculinique était bien supérieure à celle du précipité par le sulfate d'ammonium dialysé et séché qui pourtant n'était pas dénaturé. Dans le tableau ci-après nous réunissons les résultats de plusieurs déterminations :

TABLEAU VI

	Précipité par le sulfate d'ammonium dialysé	Précipité par l'acide trichloracétique
Poids minimum actif	1/100 mgr.	1/1 000 à 1/10 000 mgr.

Il n'y a donc aucune relation entre la dénaturation des protéides et leur activité tuberculinique. Des protéides dénaturés peuvent conserver leur activité tuberculinique et des protéides non dénaturés peuvent en être dépourvus à peu près complètement.

(1) SEIBERT et MUNDAY. *Amer. Rev. Tbc.* 25, 724 (1932).

**Fractionnement de la tuberculine
dans le milieu de culture des bacilles.**

Les expériences de dialyse et la comparaison de l'activité tuberculinique de différentes préparations des protéides tuberculiniques, nous ont montré que les relations entre les protéides proprement dits et la tuberculine sont assez variables et nullement obligatoires. Les expériences de fractionnement du filtrat du milieu de culture des bacilles, nous montrent, d'autre part, que les protéides proprement dits ne sont certainement pas les supports uniques de l'activité tuberculinique. Celle-ci est même supportée de préférence par les protéides plus simples.

Depuis R. KOCH (1) de nombreux auteurs ont contribué à l'étude de cette question. Il faut mettre à part les travaux effectués sur la tuberculine brute ; ce matériel ne convient, en effet, nullement à un fractionnement physico-chimique. D'abord, parce que toutes les substances biologiques complexes ont été complètement transformées par le chauffage et après, parce qu'il contient un grand excès de peptones et d'albumoses. Le fractionnement des milieux de culture synthétiques des bacilles tuberculeux fut surtout étudié plus récemment, en particulier par ZINSSER et MUELLER (2) et LONG et SEIBERT (3). Ces auteurs trouvent que la plupart des réactifs ne précipitent que fort incomplètement la substance tuberculinique active, d'autres, comme le tannin et les sels de mercure, la précipiteraient par contre entièrement. SEIBERT et LONG étudient surtout l'action du sulfate d'ammonium et trouvent que ce dernier précipite à saturation toute substance active contenue dans les milieux de culture synthétiques. Ce fait constituerait une nouvelle preuve en faveur de la nature protéidique de la tuberculine.

Nous n'avons pas vérifié ces expériences parce qu'il est très difficile de déterminer l'activité tuberculinique des filtrats satu-

(1) R. KOCH. *Deutsche med. Wchschr.*, **17**, 1189 (1891).

(2) ZINSSER et MUELLER. *Jour. Exper. Med.*, **41**, 159 (1925); MUELLER. *Jour. Exper. Med.*, **43**, 1 (1926).

(3) LONG et SEIBERT. *Amer. Rev. Tbc.*, **13**, 398 et 408 (1926).

rés avec du sulfate d'ammonium. Il faudrait dialyser ces derniers (ce qu'ont fait aussi SEIBERT et LONG) et nous avons vu que la dialyse a une influence profonde sur l'activité tuberculinique. Pour vérifier s'il y a une relation réelle entre l'activité tuberculinique des filtrats et les protéides et protides plus simples qui s'y trouvent, nous les avons fractionné successivement par de l'acide trichloracétique, puis par de l'acide phosphotungstique. L'emploi successif de ces deux agents élimine, en effet, d'une façon quantitative les protéides, les albumoses et les peptones (1).

Protocoles expérimentaux.

Nous avons effectué deux séries d'expériences. Dans une première série nous avons précipité le filtrat du milieu de culture synthétique successivement par de l'acide trichloracétique, puis par de l'acide phosphotungstique, et dans une deuxième série nous avons effectué les précipitations directement par de l'acide phosphotungstique à des concentrations variables. Pour précipiter les filtrats par de l'acide phosphotungstique, nous avons toujours acidifié ceux-là par de l'acide sulfurique jusqu'à une concentration finale de N/2 à peu près.

Pour déterminer l'activité tuberculinique nous avons dissout le précipité trichloracétique dans de l'eau à la neutralité et nous avons traité le précipité phosphotungstique par de la baryte ajoutée jusqu'à une réaction légèrement alcaline, puis nous avons filtré et le filtrat fut neutralisé par de l'acide sulfurique dilué jusqu'au virage du tournesol (rouge-vineux). Les eaux-mères de précipitation de l'acide phosphotungstique furent simplement neutralisées avec de la soude, nous avons, en effet, pensé qu'en précipitant l'acide phosphotungstique, nous aurions pu entraîner la tuberculine qui a pu rester dans le filtrat. Nous avons d'ailleurs vérifié que l'acide phosphotungstique, aux concentrations employées, n'a aucune influence irritante sur la peau des cobayes.

A titre d'exemple nous reproduisons l'une de nos expériences :

(1) HAHN, *Biochem. Ztsch.*, 121, 262 (1921).

A 500 cm³ d'un filtrat de milieu de culture synthétique (Sauton) de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée, culture âgée de 6 semaines) nous avons ajouté 40 grammes d'acide trichloracétique. Le précipité fut séparé par centrifugation, puis dissout dans de l'eau distillée à l'aide de quelques gouttes de soude normale, le volume de la solution fut enfin complété à 10 cm³. Aux eaux-mères nous avons ajouté 15 grammes d'acide phosphotungstique mis en suspension dans un petit volume d'eau, et 10 cm³ d'acide sulfurique pur. Un précipité est apparu qui fut séparé par centrifugation, puis transvasé dans un mortier et trituré pendant une demi-heure environ en présence d'une solution saturée de baryte, ajoutée en quantité suffisante pour avoir une réaction légèrement alcaline (virage au bleu-verdeâtre du papier au bleu de bromothymol). Le mélange fut enfin jeté sur un papier filtre et la fraction insoluble lavé à l'eau distillée. Le filtrat fut neutralisé par une solution diluée d'acide sulfurique, filtré de nouveau et complété à 20 cm³ avec de l'eau distillée. Les eaux-mères recueillies après la précipitation par l'acide phosphotungstique, furent neutralisées par de la soude.

Nous avons déterminé la teneur en azote du précipité trichloracétique et celle de l'élution du précipité phosphotungstique et l'activité tuberculinique du filtrat du milieu de culture primitif, du précipité trichloracétique, du précipité phosphotungstique et du filtrat déféqué. Les résultats sont reproduits dans le tableau n° VII.

Discussion des résultats.

Dans toutes nos expériences, l'acide trichloracétique ne précipitait qu'une fraction faible de l'activité tuberculinique totale des filtrats (1/10^e à peu près), tandis que le précipité phosphotungstique entraînait toute l'activité. Cet entraînement s'effectuait directement aussi, sans précipitation préalable au moyen de l'acide trichloracétique. Cependant il fallait employer l'acide phosphotungstique à une concentration assez élevée, à une concentration de 1 p. 100 la précipitation n'était, en effet, pas encore complète. L'élution du précipité phosphotungstique au moyen de la baryte réussissait en général très bien et nous

avons ainsi trouvé que pratiquement la totalité de l'activité tuberculinique se retrouve dans ce précipité. Le précipité phosphotungstique est donc au moins 10 fois plus actif que le précipité trichloracétique, étant donné que l'azote contenu dans ce dernier dépasse la teneur en azote du précipité phosphotungstique (voir tableau n° VII).

TABLEAU VII

Activité tuberculinique des différentes fractions obtenues à partir du filtrat du milieu de culture synthétique des bacilles tuberculeux.

	Activité tuberculinique			Mgr. d'azote par litre du milieu de culture
	1/10	1/100	1/1.000	
Milieu de culture complet. .	++++	++	+	—
Précipité trichloracétique . .	++	+	0	32
Précipité phosphotungstique .	+++	++	+	18
Filtrat défecté	0	0	0	—

Les dilutions se rapportent au milieu de culture complet. L'activité tuberculinique fut déterminée par l'injection intradermique à des cobayes tuberculeux.
 ++++ = papule nécrotique, +++ = papule hémorragique, ++ = grande papule, + = papule.

La presque totalité de l'activité tuberculinique des milieux de culture est donc entraînée avec la fraction protéosique de ceux-ci, qui pourtant constitue du point de vue pondéral une proportion moindre des protides totaux. La tuberculine paraît donc être un protide plus simple, différent des protéides proprement dits. Cette conclusion est en bon accord avec tous les autres résultats obtenus par nous. En particulier, nous avons vu que la tuberculine traverse partiellement les membranes de collodion et que l'activité supportée par l'unité de poids d'azote contenu dans les dialysats, dépasse en général celle des fractions colloïdales. D'autre part, les relations entre protéides et l'activité tuberculinique ne paraissaient pas être constantes et obligatoires, ni du point de vue biologique

(sensibilisation), ni du point de vue physico-chimique (dénaturation).

Les protéides naturels sont constitués par des polypeptides, unis dans des systèmes plus ou moins dissociables et réversibles (SØRENSEN, The SVEDBERS). Une série continue d'intermédiaires pourrait donc facilement exister entre polypeptides individuels, protéoses et protéides proprement dits. Aussi il n'est pas étonnant que, si la tuberculine est l'un de ces polypeptides, les protéides comme les protéoses bacillaires puissent être des tuberculines actives. Cependant, nous ne pensons pas que la tuberculine soit un polypeptide banal, identique à tous points aux autres polypeptides qui constituent les protéides du bacille de Koch. Le « polypeptide tuberculinique » n'a, en effet, que des relations assez peu étroites avec les protéides tuberculiniques proprement dits. Il a une existence individuelle, indépendante des protéides. Nous admettons donc que la tuberculine est une substance particulière, qui s'adsorbe volontiers aux protéides bacillaires, mais il peut quitter ces derniers et exister isolément ou attaché à d'autres complexes.

L'étude de l'extraction de la tuberculine des corps bacillaires que nous allons entreprendre ci-après, nous fournira de nouvelles preuves en faveur de la nature tout à fait particulière de la tuberculine.

II. — *Essais d'extraction de la tuberculine des corps bacillaires.*

Les corps bacillaires contiennent de la tuberculine tout comme leur milieu de culture. Les chercheurs de l'époque de R. Koch ont même admis que la tuberculine est extraite des corps bacillaires au cours de la stérilisation des bacilles et que ce n'est pas un processus biologique proprement dit qui l'a fait apparaître dans le milieu de culture. Depuis lors, de nombreux auteurs ont démontré que la tuberculine est produite en grande quantité par les bacilles vivants au cours de leur développement. Il est non moins vrai qu'à part cette exo-tuberculine, les corps bacillaires contiennent encore une endo-tuberculine très active. La preuve fondamentale en était fournie par R. Koch lui-même qui compara, le premier, l'influence exercée par des

bacilles vivants ou morts injectés à des animaux tuberculeux à celle exercée par les extraits bacillaires (1). A. BOQUET fit une étude systématique de la question et dosa l'activité tuberculinique des corps bacillaires (2). L'activité de ceux-ci est très grande, elle atteint ou dépasse même celle des milieux de culture.

Cependant on n'a jamais fait une étude systématique de l'extraction de la tuberculine des corps bacillaires. Nous avons entrepris cette étude principalement pour voir l'état physico-chimique de l'endo-tuberculine bacillaire. La plupart de nos expériences furent effectuées avec des bacilles vivants. Nous avons voulu étudier, en effet, l'état physique de la tuberculine dans les corps bacillaires aussi peu dénaturés que possible.

Description des expériences.

A) Bacilles vivants.

Nous avons toujours travaillé sur des bacilles de KOCH de souche bovine (Vallée), cultivés sur milieu synthétique (Sauton) pendant 6 semaines, recueillis vivants et filtrés sur papier, puis lavés à l'eau. Sur ces bacilles nous avons essayé l'influence : a) des solvants aqueux, en présence ou non d'antiseptiques et celle b) des solvants organiques (glycérol, alcool éthylique, acétone ou éther).

1. *Solvants aqueux.* — a) *Extrait salin des bacilles vivants.* — Les bacilles furent mis en suspension dans du sérum physiologique; la suspension fut gardée à la glacière pendant une semaine et agitée fréquemment avec des perles de verre. Toutes ces opérations furent conduites de façon à éviter toute contamination microbienne. Au bout d'une semaine les bacilles furent filtrés sur papier et le filtrat fut passé de nouveau sur bougie de Chamberland L².

b) *Macération des bacilles en présence d'acide phénique.* — Les bacilles furent mis en suspension dans du sérum physiolo-

(1) R. KOCH. *Deutsche med. Wchschr.*, (1891), 101 et 189.

(2) A. BOQUET. *C. R. Soc. Biol.*, 110, 769 (1932).

gique phéniqué à 5 p. 1.000, conservés à la glacière pendant une semaine, puis traités comme ci-dessus.

c) *Macération des bacilles dans du sérum physiologique sous toluol.* — Même traitement que dans les expériences précédentes.

d) *Extrait salin des bacilles à température élevée.* — Les bacilles en suspension dans de l'eau physiologique à 9 p. 1.000, furent maintenus à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

2. *Solvants organiques.* — a) *Glycérol.* — Les bacilles furent mélangés avec : 1° du glycérol anhydre, 2° du glycérol à 50 p. 100 dans l'eau et 3° du glycérol légèrement alcalin. Les mélanges furent gardés à 37° pendant 24 heures et ils furent agités fréquemment.

b) *Extrait alcoolique des bacilles.* — Les bacilles vivants furent macérés dans un excès d'alcool à — 10°, pendant une heure. Au bout de ce temps, l'alcool fut décanté et on lava les bacilles plusieurs fois à l'alcool, toujours à — 10°. Les extraits alcooliques réunis furent filtrés sur bougie de porcelaine L², puis on évapora l'alcool dans le vide et on dilua le résidu aqueux, constitué par une émulsion épaisse de graisses, dans de l'eau à un volume connu.

c) *Extrait acétonique des bacilles.* — Cet extrait fut obtenu comme l'extrait alcoolique.

d) *Extrait éthéré des bacilles.* — Les bacilles vivants furent déshydratés par l'alcool absolu, puis lavés à celui-ci 4 à 5 fois, enfin lavés à l'éther un grand nombre de fois pour éliminer l'alcool et gardés en présence de l'éther anhydre pendant 2 heures. L'extrait éthéré fut filtré sur filtre d'amianté (Seitz), puis transvasé dans un verre à pied contenant un volume connu d'eau physiologique à 9 p. 1.000 et l'éther chassé par un courant d'air rapide. Nous avons ainsi obtenu, en général, une émulsion suffisamment stable.

Tous ces extraits furent dilués à 10 p. 100 en volume par rapport aux corps microbiens secs (*) qui avaient servi pour l'extraction; ils furent essayés à des concentrations diverses au point de vue tuberculinique. Les résultats sont réunis dans le tableau n° VIII.

(*) Cette concentration correspond sensiblement à celle de la tuberculine brute.

TABLEAU VIII

Activité tuberculinique des différents extraits obtenus à partir de bacilles vivants.

	Volume minimum actif au point de vue tuberculinique
1) Extrait salin (agité en présence de perles de verre)	1/500 cm ³
2) Acide phénique à 5 p. 1.000.	1/100 cm ³
3) Toluol.	inactif ou au 1/10
4) Glycérol anhydre	0
5) Glycérol alcalin.	1/100 cm ³
6) Glycérol à 50 p. 100	0
7) Eau de cuisson	1/500 cm ³
8) Extrait alcoolique (*).	1/10.000 cm ³
9) Extrait acétonique (**).	0
10) Extrait éthéré	1/10.000 cm ³

L'activité tuberculinique fut déterminée par la réaction intradermique provoquée chez des cobayes tuberculeux. Une réaction positive fut caractérisée par la formation d'une papule 24 heures après l'injection. 1 cm³ de chacun des extraits correspond à 10 centigrammes de corps bacillaires secs. Cette concentration équivaut sensiblement à celle de la tuberculine brute. En effet, 100 cm³ de bouillon de culture de 8 semaines correspond sensiblement à 1 gramme de corps bacillaires secs et dans la préparation de la tuberculine brute, le milieu de culture est concentré à peu près au 1/10^e de son volume. De chaque dilution nous avons injecté 1/10^e de cm³, 1/100^e de cm³ correspond donc à une dilution de la tuberculine brute au 1/10^e.

(*) Sur 11 extraits alcooliques étudiés, 8 étaient actifs et 3 inactifs. La raison de ces résultats un peu variables nous échappe complètement, en effet, l'extraction ne dépend ni du titre alcoolique (voir plus loin), ni de la réaction. Cependant, il est probable qu'il s'agit ici de phénomènes d'adsorption et ceux-ci peuvent varier sous l'influence de changements incontrôlables.

(**) Sur 9 extraits acétoniques étudiés, un était actif, et même très actif. Ce fait contradictoire confirme l'hypothèse que nous avons émise dans l'objection précédente.

Nous voyons donc que l'eau ou le glycérol n'extraient des bacilles vivants que des quantités infimes de tuberculine. L'extraction réussit par contre très bien au moyen de l'alcool et de l'éther qui sont les solvants classiques des substances lipoidiques. Le plus curieux c'est qu'un autre solvant organique, l'acétone qui pourtant dissout bien certaines substances lipoidiques (cires et glycérides), n'extraît pas de tuberculine des bacilles vivants.

B. — *Bacilles morts.*

Nous avons étudié d'une part l'extraction de la tuberculine des bacilles tués par l'alcool à basse température et dégraissés à l'éther et d'autre part des bacilles chauffés à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

a) *Bacilles tués par l'alcool et l'éther.* — Les bacilles vivants furent recueillis sur un papier filtre, lavés avec de l'eau distillée, refroidis à 0°, puis complètement déshydratés par l'alcool absolu refroidi à — 10° enfin gardés en présence d'alcool froid pendant 3 heures. Au bout de ce temps ils furent lavés 3 à 4 fois à l'alcool absolu à — 10°, un grand nombre de fois à l'éther anhydre froid et laissés en présence de l'éther anhydre froid pendant 2 heures. Ils furent enfin jetés sur un entonnoir de BUCHNER et lavés un grand nombre de fois à l'éther, séchés d'abord par un courant d'air et après dans le vide sulfurique (*). Les bacilles ainsi obtenus furent pulvérisés et la poudre blanche, représentant les corps bacillaires, fut triturée dans un mortier avec du sable en présence de quelques centimètres cubes d'un tampon de phosphate M/15 de ρH 7.6. La bouillie bacillaire fut transvasée dans un flacon et soumise à l'agitation continue pendant 3 à 4 heures, puis gardée à la glacière pendant 3 jours et au bout de ce temps, agitée de nouveau pendant 3 à 4 heures. La deuxième partie de l'opération fut conduite en présence d'un volume connu du même tampon phosphate que la première opération, et de l'acide phénique à 5 p. 1.000. L'extrait fut centrifugé, décanté et le liquide fortement opalescent, fut filtré sur papier, puis sur filtre d'amiante (filtre de SERTZ « pour sérum »).

Dans d'autres expériences les bacilles, préparés de la même façon, furent broyés avec du sable et traités avec du glycérol anhydre pendant 24 heures. Nous avons enfin préparé, toujours à partir du même matériel, des extraits directs, sans broyage,

(*) La présence d'éther empêche le « mouillage » par l'eau et les bacilles forment des grumeaux émulsionnés qui surnagent. Il faut donc complètement chasser l'éther, mais à l'étuve à 37° les bacilles s'oxydent et deviennent noirs. Le meilleur moyen est le vide sulfurique, où l'éther est absorbé très rapidement.

ni d'agitation avec des tampons phosphates acides (pH 4.8) ou alcalins (pH 8.2).

En ce qui concerne la constitution chimique de tous ces extraits aqueux, nous voudrions insister sur un fait curieux. En effet, leur teneur en protéides vrais, précipitables par de l'acide trichloracétique, était toujours minime, de l'ordre de 3 à 5 milligrammes pour 1 gramme de corps bacillaires secs, et l'azote protéidique vrai ne constituait que $1/8^e$ très sensiblement de l'azote total.

Les extraits glycéринés, comme les extraits phosphatés, étaient tous actifs du point de vue tuberculinique. L'activité conservait toujours à peu près le même ordre de grandeur. Une solution, dont 1 cm^3 correspondant à 0 gr. 1 de bacilles secs, provoquait une réaction papuleuse jusqu'au $1/1000^e$ de centimètres cubes à peu près. Les réactions étaient en général très faibles, même pas hémorragiques pour les concentrations élevées. Ces activités restaient donc toujours bien inférieures à celle des extraits alcooliques.

b) *Bacilles chauffés*. — Sur ce matériel nous avons vérifié les expériences de BOQUET et NÈGRE (1) qui confirment d'ailleurs ce que nous avons trouvé au sujet des bacilles vivants. Les bacilles furent déshydratés par l'acétone, puis gardés en présence de celle-ci pendant 48 heures. Le résidu aqueux de l'extrait acétonique évaporé était toujours inactif du point de vue tuberculinique. Les bacilles déshydratés furent traités à l'alcool méthylique, puis celui-ci fut évaporé et le résidu, mis en émulsion dans l'eau, essayé du point de vue tuberculinique. L'activité tuberculinique de l'extrait méthylique était de même ordre de grandeur que celle de l'extrait alcoolique direct des bacilles vivants.

Résumé et discussion des résultats.

La tuberculine est donc extraite des corps bacillaires très mal par l'eau et le glycérol, pas du tout par l'acétone et très bien par l'alcool méthylique ou éthylique et par l'éther. Elle paraît donc épouser les propriétés de solubilité de certaines substances

(1) BOQUET et NÈGRE. *Annales de l'Institut Pasteur*, **37** (1923).

lipoidiques, en particulier des phosphatides. Ce fait est d'autant plus étonnant que, comme nous l'avons vu, la tuberculine contenue dans les milieux de culture des bacilles, épouse les propriétés de solubilité des protéoses (solubilité dans l'eau et précipitabilité par l'acide phosphotungstique). Avant de conclure définitivement sur la signification de ce fait, nous avons soumis à une étude approfondie les relations physico-chimiques qui existent dans les extraits alcooliques entre la tuberculine et les substances lipoidiques.

III. — *Relations entre les substances lipoidiques et la tuberculine contenue dans les corps bacillaires.*

La première objection qui se posait était de savoir si la tuberculine contenue dans les corps bacillaires est réellement soluble dans l'alcool très concentré. En effet, l'alcool relativement concentré (80°) dissout de grandes quantités de protéides contenues dans certaines graines (gluthéline du froment par exemple). La tuberculine pourrait ainsi être un protéide assez soluble dans l'alcool qui est simplement libéré de ses attaches contractées par adsorption aux corps bacillaires. Dans ce cas cependant l'alcool très concentré (au-dessus de 90°) ne doit pas contenir de tuberculine.

Pour vérifier ce point, nous avons traité des bacilles vivants, lavés, successivement plusieurs fois par l'alcool absolu et les extraits alcooliques successifs furent recueillis séparément. Chaque extrait fut filtré sur bougie de Chamberland L² et la concentration alcoolique des filtrats tout à fait limpides fut déterminée par un alcoomètre. L'eau contenue dans les bacilles hydratés, suffit à baisser considérablement le titre alcoolique des premiers extraits et nous avons obtenu par ce procédé une série d'extraits alcooliques de titre continuellement croissant. L'alcool de chaque extrait fut chassé dans le vide et le résidu aqueux essayé du point de vue tuberculinique (tableau n° IX).

Tous ces extraits étaient donc à peu près également actifs, de sorte que nous avons ainsi obtenu une tuberculine très active à partir d'une solution alcoolique absolument limpide (filtré sur

bougie de porcelaine L²) titrant 98°. Ce fait, lié à l'extraction de la tuberculine par de l'éther, montrait que la tuberculine ne peut appartenir à un groupe connu de protéides parce que tous les protéides connus sont insolubles dans l'alcool à 98° ou dans l'éther.

TABLEAU IX

*Activité tuberculinique des extraits alcooliques
de titre variable.*

Concentrations alcooliques.	38,5°	82°	88°	98°
Volume minimum actif.	1/1 000 cm ³	1/1.000 cm ³	1/1.000 cm ³	1/1.000 cm ³
Les concentrations alcooliques sont exprimées en degrés alcoométriques. Les dilutions furent toujours effectuées en partant d'une solution mère dont 1 cm ³ correspondait à 0 gr. 1 de corps bacillaires secs.				

Le plus probable c'était d'admettre que la tuberculine est fixée à certaines graisses dans les corps bacillaires, d'autant plus que, comme nous l'avons vu, certains extraits obtenus par les solvants organiques étaient inactifs et que ce complexe épouse les propriétés de solubilité de sa fraction lipidique. Pour voir, si notre hypothèse correspond à la réalité, nous avons fractionné les extraits alcooliques.

*Relations entre les graisses et la tuberculine
dans les extraits alcooliques.*

Nous avons constaté tout d'abord le fait intéressant que bien que tous ces extraits contiennent une quantité considérable d'azote, les réactions des protéides se sont néanmoins montrées négatives à toutes les concentrations. Ce fait ne permet pas une conclusion définitive parce que les activités biologiques sont souvent supportées par des poids infimes de substances, dont les concentrations peuvent être situées bien au delà de la sensibilité de n'importe quelle méthode chimique.

Nous avons ensuite recherché si les graisses extraites par l'alcool sont, elles-mêmes, actives au point de vue tuberculinique. Cette étude fut effectuée de deux manières différentes : 1° Une série d'émulsions aqueuses d'extraits alcooliques fut extraite par l'éther dans des entonnoirs à décantation. Une partie seulement des graisses passe dans l'éther, l'autre partie reste en émulsion et monte, en général, dans la phase éthérée dont elle occupe la partie inférieure. Nous avons décanté isolément la phase aqueuse, l'émulsion et la phase éthérée. Nous avons chassé l'éther des deux premières fractions par un courant d'air. La phase éthérée fut filtrée sur papier, puis transvasée dans un verre à pied contenant un volume connu d'eau et l'éther chassé par un courant d'air. Nous avons ainsi obtenu des émulsions blanches, stables et quelques parcelles de graisses molles, colorées en jaune, qui surnageaient, mais qui se mettaient en émulsion pendant quelques minutes après une bonne agitation. Les trois fractions furent enfin injectées à des dilutions variables dans le derme de cobayes tuberculeux. Les résultats obtenus figurent dans le tableau n° X.

La tuberculine contenue dans les extraits alcooliques, ne passe donc jamais dans la phase éthérée, mais elle a, par contre, une tendance remarquable de s'adsorber aux émulsions de graisses, même si celles-ci passent dans la phase éthérée. L'adsorbabilité de la tuberculine par les émulsions de graisses se manifeste aussi dans la phase aqueuse. En effet, dans les quelques cas où nous avons pu casser totalement les émulsions aqueuses d'extraits alcooliques, en acidifiant par de l'acide chlorhydrique dilué et en centrifugant et filtrant, les phases aqueuses, limpides étaient dépourvues de toute activité tuberculinique.

2° L'autre série d'expériences fut effectuée sur des extraits alcooliques évaporés complètement dans le vide et desséchés. Pour entraîner les dernières traces d'humidité qui auraient pu persister après l'évaporation complète de nos extraits, nous avons ajouté aux résidus quelques centimètres cubes d'alcool absolu et nous avons desséché de nouveau complètement dans le vide. Ensuite, les résidus furent repris successivement : a) par de l'alcool absolu, b) par de l'éther anhydre, c) par du chloroforme anhydre, d) par de l'eau distillée et e) une der-

TABLEAU X

Activité tuberculinique des différentes fractions de l'extrait alcoolique.			
1° Traitement par l'éther dans des entonnoirs à décantation.			
	Fraction éthérée	Fraction d'émulsion	Fraction aqueuse
Volume minimum actif.	0	1/100 à 1/1.000 cm ³	1/100 à 1/1.000 cm ³
2° Activité tuberculinique de différentes fractions obtenues à partir d'extraits alcooliques de bacilles vivants évaporés à sec.			
a) Solubilité de la tuberculine dans les solvants organiques.			
	Alcool absolu	Ether anhydre	Chloroforme
Réaction dermique . . .	+++	+++	0
	Eau distillée	Emulsion aqueuse	
Réaction dermique . . .	++	+	
b) Fractionnement de la fraction aqueuse.			
	Activité tuberculinique		
	1/5	1/50	
Filtrat primitif.	+++	+	
Filtrat déféqué par PbOH + NH ³ .	+++	+	
Filtrat primitif.	+++	+	
Filtrat déféqué par l'acide phosphotungstique	+++	+	
Toutes les dilutions furent effectuées à partir d'une solution mère, dont chaque centimètre cube correspondait à 0 gr. 1 de corps bacillaires secs. Les différentes solutions obtenues à partir des extraits desséchés, furent diluées toutes au 1/50* et injectées à différents endroits dans la peau d'une même série de cobayes. L'activité tuberculinique fut déterminée par la réaction dermique provoquée chez des cobayes tuberculeux 24 heures après l'injection.			
++++ = papule nécrotique, +++ = papule hémorragique,			
++ = grande papule, + = papule.			

nière fraction, insoluble dans tous ces solvants, fut mise en émulsion dans de l'eau légèrement alcaline. Chaque solution fut centrifugée, puis filtrée et le dépôt dans le tube à centrifuger, comme le papier-filtre qui avait servi pour la filtration, furent rincés par le solvant suivant. A toutes les solutions obtenues par les solvants organiques, nous avons ajouté des volumes connus d'eau physiologique, puis nous avons chassé le solvant organique dans le vide à basse température et le résidu fut complété par de l'eau distillée au volume d'eau physiologique ajouté. Nous avons enfin essayé l'activité tuberculinique de ces cinq préparations (voir tableau n° X).

La tuberculine extraite des bacilles vivants par l'alcool, est nettement soluble dans l'alcool absolu et l'éther anhydre, mieux dit elle est entraînée en partie avec des graisses solubles dans l'alcool et en partie avec des graisses insolubles dans l'alcool et solubles dans l'éther. Cet entraînement de la tuberculine par les différentes fractions lipidiques a cependant un certain caractère spécifique. Nous avons déjà vu que la tuberculine des corps bacillaires est insoluble dans l'acétone et ici nous voyons qu'elle n'est pas entraînée avec les substances lipidiques insolubles dans l'alcool et l'éther et solubles dans le chloroforme (en effet, une telle fraction existait réellement dans nos extraits).

Cependant les solvants organiques ne dissolvaient pas toute substance active et il nous restait une tuberculine résiduelle, insoluble dans les solvants organiques et soluble dans l'eau. Les substances organiques qui constituaient cette fraction, contenaient en moyenne 1 p. 100 de leur poids d'azote, et, après hydrolyse acide, le quart de leur poids de substances réductrices exprimées en glucose. Les réactions des protides étaient insensibles et l'acide trichloracétique ne produisait pas de précipité. Nous avons fractionné ces filtrats par l'acide phosphotungstique et par l'hydroxyde de plomb ammoniacal et nous avons vu que ces réactifs n'ont aucune influence sur leur activité tuberculinique (voir tableau n° X). Le support de la tuberculine contenue dans cette fraction, n'était donc ni un polyholoside complexe, ni un protéide ou une protéose.

Résumé des résultats obtenus dans le présent chapitre.

La tuberculine est extraite des corps bacillaires par l'alcool à 98° et par l'éther anhydre. La substance active, contenue dans ces extraits, est attachée à des graisses solubles en partie dans l'alcool et en partie dans l'éther.

Tous les résultats obtenus tendent à prouver que la tuberculine des corps bacillaires est fixée, tout au moins en partie, dans un complexe avec certaines substances lipoidiques, vraisemblablement des phosphatides. Cependant, ce complexe n'est vraisemblablement que de nature adsorptive parce qu'il est détruit très facilement. C'est probablement par ce fait que certains extraits lipoidiques sont inactifs du point de vue tuberculinique et qu'une partie de la tuberculine extraite des corps bacillaires par des solvants organiques, devient, au cours des manipulations, insoluble dans ceux-ci et soluble dans l'eau. Enfin le fait qu'en présence d'éther et d'eau dans des entonnoirs à décantation la tuberculine ne passe jamais dans la phase éthérée, plaide aussi en faveur de cette hypothèse.

IV. — Nature physico-chimique de la tuberculine.

Notre travail peut être divisé en deux parties et cette division est une vraie « classification naturelle ». En effet, la tuberculine contenue dans le milieu de culture des bacilles, que nous avons étudié dans un premier chapitre, paraît être foncièrement différente de la tuberculine contenue dans les corps bacillaires. L'une nous est apparue comme un polypeptide ou une albumose et l'autre comme une graisse. Faudrait-il en conclure à l'existence de deux principes chimiques différents qui provoquent les mêmes réactions avec les mêmes caractères chez les cobayes tuberculeux ? *A priori* ce n'est pas impossible, seulement très peu probable. Il serait bien plus logique d'admettre que la tuberculine n'est identique ni aux protéoses des milieux de culture, ni à des substances lipoidiques des corps bacillaires, mais qu'elle est une impureté adsorbée par les unes et par les autres.

Quelle est la nature chimique de cette impureté ? Nous n'en savons pour le moment rien de précis. Toutefois la sensibilité extraordinaire de l'activité tuberculinique aux infections et, en particulier, aux effets protéasiques, rend probable l'hypothèse qu'elle est un polypeptide ou une protéose. Cependant, il est certain que la substance tuberculinique n'est pas une protéose banale. C'est principalement une substance d'une adsorbabilité extraordinaire qui épouse entièrement les propriétés de solubilité des autres substances contenues dans son ambiance.

Le problème physico-chimique de la tuberculine se pose ainsi exactement comme pour les diastases. Nous retrouvons encore la substance active excessivement adsorbable et ses supports. Cependant ces supports ne sont pas absolument quelconques et, si *in vitro* l'adsorbabilité de la substance active paraît être indifférente, la cellule vivante paraît pouvoir former des complexes d'adsorption assez bien définis. La tuberculine qui passe dans les milieux de culture, accompagne les protides, l'endo-tuberculine est adsorbée principalement par des substances lipoïdiques et seulement par certaines de ces substances. Les caractères de solubilité des lipides tuberculiniques prennent même une allure spécifique, ce qui permet de supposer que certains complexes d'adsorption bien déterminés (par exemple phosphatido-tuberculiniques) peuvent exister dans les corps bacillaires.

CHAPITRE III

ANTIGÈNE PROTÉIDIQUE

Constitution physico-chimique des protéides du milieu de culture des bacilles tuberculeux et étude de leurs propriétés antigéniques ()*.

Ce travail fut effectué sur une seule préparation des protéides bacillaires; ceux-ci furent obtenus à partir des filtrats du milieu de culture synthétique (SAUTON) des bacilles qui furent saturés par le sulfate d'ammonium et le précipité fut dialysé et séché. C'est la préparation n° 1 du chapitre précédent (p. 54) qui a, comme nous l'avons vu, des propriétés anaphylactogènes mais qui est à peu près complètement dépourvue d'activité tuberculinique (voir pp. 68). Quelle est la constitution chimique de ces protéides et quelles sont leurs qualités antigéniques ?

Tous les protéides naturels sont antigènes, ceux-là ne sont cependant jamais bien définis du point de vue chimique. Même un protéide purifié, telle l'ovalbumine plusieurs fois recristallisée, est constitué de plusieurs espèces chimiques (1) et nos protéides n'étaient même pas purifiés. Deux problèmes s'étaient donc posés : *a)* quelles sont les impuretés de ces protéides et *b)* si ceux-ci sont des haptènes vis-à-vis les sérums de tuberculeux, le sont-ils par leurs qualités antigéniques propres ou à la faveur de certaines impuretés adsorbées ?

Ces deux problèmes étaient déjà étudiés, toutefois d'une façon incomplète, en ce qui concerne les protéides bacillaires

(*) Ce travail fut effectué en collaboration avec W. SCHÆFER et en partie publié dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, 53, 72 (1934).

(1) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. Laboratoire Carlsberg*, Vol. 18, n° 5, 1930.

en général et aussi en ce qui concerne, comme dans notre cas, les protéïdes contenus dans le milieu de culture des bacilles. La plupart des auteurs qui ont constaté que des protéïdes bacillaires réagissent avec des anticorps contenus dans les sérums de tuberculeux, n'ont pas pris en considération que ces réactions peuvent être dues à des impuretés adsorbées. M. PINNER (1) insiste sur la présence d'impuretés lipidiques dans les protéïdes bacillaires et, d'après cet auteur, ceux-ci ne seraient des haptènes vis-à-vis des sérums de tuberculeux que parce qu'ils contiendraient de l'antigène lipodique.

Expériences personnelles.

Analyse chimique des protéïdes.

Les protéïdes tuberculiniques, transformés en poudre, se peptisaient assez mal dans l'eau distillée, ils se dissolvaient par contre bien dans la soude diluée et la solution restait stable après neutralisation; ils donnaient dans une solution à 2 p. 1.000, toutes les réactions des protéïdes et une réaction de MOLISCH pour les glucides nettement positive. Nous avons déterminé: *a*) leur teneur en azote par la méthode de KJELDAHL; *b*) leur teneur en groupements réducteurs après hydrolyse, par la méthode de G. BERTRAND; *c*) leur teneur en phosphore d'après M. A. MACHEBOEUF (2) et *d*) leur extrait lipodique d'après KUMAGAWA-SUTO. Les résultats obtenus sur deux préparations protéïdiques différentes, sont reproduits dans le tableau ci-après (tableau n° XI).

Notre poudre était donc constituée par un mélange de glucides et de protéïdes, contenant des lipides et avant d'être fixé sur le rôle biologique exact du protéïde, il fallait le fractionner et déterminer l'activité des différentes fractions (*).

(1) M. PINNER. *Beitr. z. Klin. d. Tuberkl.* **73**, 784 (1929).

(2) M. A. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **8**, 464 (1926).

(*) Ce fait est tout à fait général, les protéïdes naturels contiennent toujours des impuretés glucidiques et lipidiques. Les sérologistes et les biologistes doivent compter avec ce fait, d'autant plus que les activités sont supportées en biologie par des poids infimes de substances.

TABLEAU XI

Constitution chimique des protéides tuberculiniques.

	Azote	P	Sucre réducteur après hydrolyse (exprimé en glucose)	Extrait lipoidique
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100
Préparation I. . . .	11,3	0,14	23,4	6,7
Préparation II . . .	11,4	—	23,8	6,2

Pour doser les groupements réducteurs, nous avons effectué l'hydrolyse en présence d'acide sulfurique normal pendant 1 heure à 120°. L'extrait lipoidique fut obtenu dans un appareil de KUMAGAWA et l'extrait évaporé, fut repris par l'éther anhydre, puis par la benzine ; les deux solutions furent filtrées et reçues dans une fiole tarée, évaporées et séchées dans le vide sulfurique. (Pour les autres indications, voir dans le texte).

Fractionnement physico-chimique du protéide tuberculinique et activité sérologique des différentes fractions vis-à-vis des sérums de chevaux anti-B. C. G. vivant.

a) *Glucides*. — Pour obtenir les glucides contenus dans les protéides, nous avons précipité une solution aqueuse de ceux-ci par l'acide trichloracétique à 8 p. 100. Dans ces conditions, comme SEIBERT (1) l'a indiqué, les glucides restent en solution et les protéides exempts de glucides, précipitent. Aux eaux-mères acides, opalescentes, nous avons ajouté un mélange constitué par deux fois leur volume d'alcool et leur volume d'éther. Le précipité blanc ainsi obtenu, fut dissout dans l'acide trichloracétique à 8 p. 100 et après avoir éliminé toute fraction insoluble, il fut précipité de nouveau par un mélange d'alcool et d'éther (dans les proportions indiquées ci-dessus). L'acide trichloracétique fut éliminé par un excès d'éther et les dernières traces de ce dernier, furent chassées dans le vide sulfurique.

(1) FL. B. SEIBERT. *Amer Rev. Tbc.* 23, 23 (1931).

Nous avons ainsi obtenu une poudre blanche très peu soluble dans l'eau distillée, mais se dissolvant instantanément dans un milieu fortement acide (acide sulfurique $n/10$ par exemple) en donnant une solution opalescente, mais d'une limpidité parfaite qui pouvait être neutralisée sans qu'un précipité apparaisse. Dans cette poudre nous avons déterminé la teneur en azote et en phosphore, le pouvoir réducteur après hydrolyse et l'extrait lipoidique, par les méthodes indiquées ci-dessus. Le tableau n° XII réunit les résultats de deux séries d'analyses.

TABLEAU XII

*Constitution chimique de la fraction glucidique
des protéides tuberculiniques.*

	Pouvoir réducteur après hydrolyse (exprimé en glucose)	Extrait lipoidique	Azote	P
Préparation I. . . .	p. 100 87,2	p. 100 2,8	indosable	indosable
Préparation II . . .	87,1	—	»	»

La fraction glucidique ne contenait donc ni azote, ni phosphore et elle possédait, après hydrolyse, un pouvoir réducteur très élevé. Ses caractères physiques (peptisation difficile, solution opalescente, non dialysable) sont celles d'un polyholoside complexe.

b) *Protéides*. — Après l'élimination des glucides, les protéides se trouvaient sous la forme d'un précipité trichloracétique; nous avons lavé ce dernier en le dissolvant dans de l'eau et en le précipitant par de l'acide trichloracétique trois fois de suite; puis, il fut dissous dans de l'eau à la neutralité, centrifugé pour éliminer les fractions insolubles, dialysé et desséché dans le vide sulfurique. Nous avons ainsi obtenu une poudre jaune qui contenait 14,7 p. 100 d'azote, cependant elle

donnait encore une réaction de Molisch pour les glucides (*).

c) *Lipides*. — Pour les essais sérologiques nous n'avons jamais employé l'extrait lipoïdique total de nos protéides, mais seulement leur extrait alcoolique obtenu à chaud. L'activité haptène des lipides bacillaires est due, en effet, à un antigène lipoïdique et l'alcool est un bon solvant de celui-ci.

Nous avons précipité une solution aqueuse, concentrée des protéides par un excès d'alcool et nous avons chauffé le mélange à l'ébullition pendant une demi-heure, puis il fut évaporé à sec et le résidu extrait à plusieurs reprises par de l'alcool chaud, les extraits alcooliques enfin filtrés sur papier (**).

Déterminations sérologiques.

Nous avons effectué un grand nombre de réactions de fixation du complément en employant : a) comme antigènes, des dilutions variables d'une solution à 1 p. 1.000 du précipité protéidique brut, des protéides exempts de glucides et du polyholoside, et d'une solution de l'extrait alcoolique des protéides à 3 p. 1.000 en volume par rapport à ceux-ci, à laquelle nous avons ajouté goutte à goutte 4 fois son volume d'eau physiologique à 9/1.000^c ; b) comme antisérums, des sérums de chevaux qui ont reçu plusieurs injections de bacilles B. C. G. vivants. Les chiffres qui se trouvent dans le tableau n° XIII, montrent les résultats obtenus.

Toutes les fractions du protéide brut, appartenant aux différents groupes des principes immédiats, ont donc réagi et aucune de ces fractions ne contenait dans l'unité de poids plus de substance active que le protéide brut. Etant donné que l'extrait alcoolique du protéide brut était haptène vis-à-vis des

(*) Au début de nos recherches, nous avons éliminé l'acide trichloracétique en lavant les protéides précipités avec de l'éther ; puis nous les avons séchés dans le vide sulfurique. Cependant les protéides, obtenus de cette façon, sont très fortement dénaturés et acquièrent des propriétés anticomplémentaires très accusées. Ce fait est assez curieux, étant donné que l'éther ne dénature pas, en général, les protéides.

(**) Par cette méthode nous avons évité l'entraînement de protéides dans la solution alcoolique. Les protéides sont, en effet, en général très mal précipités par de l'alcool de leur solution aqueuse neutre.

sérums anti-B. C. G., notre produit contenait certainement de l'antigène lipoidique. Celui-ci pouvait s'adsorber aux protéides purifiés et aux polyholosides également et constituer ainsi l'unique haptène vis-à-vis des sérums de tuberculeux. Cependant, l'extrait alcoolique des polyholosides, obtenu dans les

TABLEAU XIII

*Activité sérologique des différentes fractions
des protéides tuberculiniques.*

2,5 unités d'alexine furent mélangées avec 0 cm³ 25 d'antigène à des dilutions variables et 0 cm³ 25 d'antisérum au 1/8°, les mélanges furent complétés à 2 cm³ 5 et maintenus à l'étuve à 37° pendant une heure. Puis nous avons ajouté à chaque mélange 0 cm³ 4 de globules rouges de mouton lavés à 5 p. 100 et 0 cm³ 4 d'une dilution de sérum de lapin anti-mouton contenant 5 à 10 unités hémolytiques. Les tubes bien mélangés, furent maintenus de nouveau à 37° pendant une demi-heure, puis les résultats lus. Les fractions de milligramme des différents antigènes qui figurent dans le tableau, furent contenus dans le dernier tube qui a encore complètement empêché l'hémolyse. Dans le cas des extraits alcooliques, les chiffres ne se rapportent pas aux poids secs de ceux-ci, mais aux poids secs de protéides bruts qui les contenaient (*).

	Protéides bruts	Extrait alcoolique	Protéides purifiées	Polyholosides
Doses minima lysantes .	1/200 mgr.	1/150 mgr.	1/150 mgr.	1/180 mgr.

(*) Le sérum anti-B. C. G. et les antigènes considérés n'avaient aucun effet anticomplémentaire aux dilutions employées.

mêmes conditions que celui des protéides bruts, était complètement inactif vis-à-vis des sérums anti-B. C. G. Au moins les polyholosides semblaient donc réagir avec un haptène différent de l'antigène lipoidique. Nous étions ainsi amenés à étudier séparément les relations entre l'haptène lipoidique et les protéides et ceux qui existent entre ces derniers et l'haptène polyholosidique.

*Relations physico-chimiques et sérologiques
entre les protéides et l'antigène lipéidique.*

Pour connaître le rôle de l'antigène lipéidique dans les propriétés antigéniques des protéides, nous avons d'abord essayé des méthodes de fractionnement physico-chimique. Celles-ci ont cependant échoué. Nous avons vu, en effet, qu'il est impossible d'extraire tout l'antigène lipéidique contenu dans les protéides, sans dénaturer ces derniers. L'alcool froid ne l'extrait jamais complètement, même pas dans un appareil à extraction continue, et l'alcool chaud dénature complètement les protéides.

Pour effectuer l'extraction continue à froid, nous nous sommes servis d'un appareil de SOXLETH, construit suivant les indications de M. A. MACHEBOEUF, permettant de travailler dans le vide. L'alcool retombait sur les protéides à une température de 15° à 18° et l'extraction fut continuée pendant 8 à 10 heures. L'extrait alcoolique obtenu à chaud de ces protéides traités par l'alcool froid était cependant encore actif.

Comme les méthodes physico-chimiques avaient échoué, nous avons pris une voie biologique. Nous avons préparé des sérums antiprotéidiques et des sérums antilipéidiques et nous avons comparé l'activité fixatrice du complément de nos protéides vis-à-vis de ces deux sortes de sérums.

Pour avoir des sérums antilipéidiques purs, il fallait choisir un antigène lipéidique ne contenant pas de protéides. Nous nous sommes servis de l'antigène méthylique de BOQUET et NÈGRE. Celui-ci peut cependant encore contenir des traces de protéides, nous l'avons donc évaporé à sec et repris par de l'alcool absolu. De cette deuxième solution alcoolique nous avons éliminé toute fraction insoluble en la filtrant sur papier-filtre serré, sans plis (*). A un volume connu de ce filtrat, nous avons ajouté 1/3 de son volume d'eau physiologique à 9 p. 1.000 et le mélange fut concentré dans le vide jusqu'au 1/5^e de son volume à peu près, puis complété au 1/4 de son

(*) Nous nous sommes servis du papier-filtre « Delta » (Dueren, Rheinland) particulièrement apte pour retenir des précipités protéidiques fins.

volume avec de l'eau distillée. Nous avons ainsi obtenu une émulsion aqueuse très stable, dont 1 cm³ correspondait à 3 cm³ d'antigène méthylrique (*). Nous avons injecté dans les veines de l'oreille de plusieurs lapins 1 cm³ de cette émulsion 6 fois de suite à 3 jours d'intervalle et un autre lot de lapins a reçu, dans les mêmes conditions, 6 injections de 0 gr. 01 de protéides tuberculiniques brutes. Le sang de tous ces lapins fut prélevé avant la première injection et nous avons vérifié qu'aucun de ces sérums ne contenaient d'anticorps normaux vis-à-vis des deux antigènes employés. Nous avons finalement fait des prises de sang 7 à 10 jours après la dernière injection et avec les sérums antilipoïdiques et antiprotéïdiques ainsi obtenus, nous avons fait des réactions de fixation du complément vis-à-vis des protéides totaux et de l'antigène méthylrique. Les résultats sont réunis dans le tableau n° XIV.

TABLEAU XIV

*Teneur en anticorps protéïdiques et lipoïdiques
des sérums de lapins antiprotéïdiques et antilipoïdiques.*

Nous avons effectué des réactions de fixation du complément dans les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau n° XIII (p. 92) seulement qu'au lieu de mélanger des doses constantes d'antisérum avec des doses variables d'antigène, nous avons mélangé des doses constantes d'antigènes (0 cm ³ 25 d'une solution des protéides brutes à 1 p. 1.000 et 0 cm ³ 25 d'une dilution d'antigène méthylrique au 1/15 ^e dans de l'eau physiologique) avec des dilutions variables d'antisérums. Les antisérums protéïdiques et lipoïdiques furent essayés parallèlement avec l'antigène protéïdique et l'antigène méthylrique. Nous avons exprimé les résultats par le nombre d'unités d'alexine déviées par 1 cm ³ de sérum non dilué, en prenant comme résultat positif l'absence complète d'hémolyse.			
		Unités lipoïdiques	Unités protéïdiques
Sérums antilipoïdiques . . .	1	625	0
	2	250	0
	3	375	0
	4	500	0
Sérums antiprotéïdiques. . .	1	0	250
	2	0	250
	3	50	625
	4	75	1.250

(*) L'extraît méthylrique de BOQUET et NÈGRE est préparé de telle manière que 1 cm³ correspond à 1 centigramme de bacilles de KOCH secs; nous l'avons ici utilisé à une concentration triple.

L'antigène protéidique ne fixe donc jamais le complément en présence d'anticorps antilipoïdiques purs, par contre, il réagit très bien avec les sérums d'animaux auxquels il fut injecté. Les anticorps qui prennent naissance après l'injection des protéides tuberculiniques bruts ne réagissent enfin qu'exceptionnellement, et toujours d'une façon tout à fait secondaire, avec l'antigène lipoïdique. Les qualités haptènes de l'antigène lipoïdique contenu dans les protéides sont donc cachées et les propriétés antigéniques prédominantes des protéides tuberculiniques doivent être dues à l'existence d'autres antigènes particuliers (*).

***Relations immunologiques entre la fraction glucidique
et protéidique du protéide tuberculinique.***

Ayant démontré que le protéide est un antigène différent de l'antigène lipoïdique, nous avons recherché les relations immunologiques entre l'haptène polyholosidique et l'antigène protéidique.

Nous avons d'abord cherché s'il y a une spécificité immunologique propre du protéide, différente de celle du polyholoside. Nous avons comparé l'activité fixatrice du complément des protéides brutes et du polyholoside vis-à-vis des sérums de lapin antilipoïdique et antiprotéidique et d'un sérum de cheval anti-B. C. G. Les résultats sont réunis dans le tableau n° XV.

Le polyholoside réagit avec le sérum anti-protéidique comme avec le sérum anti-B. C. G., par contre, il ne réagit pas avec le sérum antilipoïdique. Sa spécificité sérologique est donc la même que celle des protéides et, ce qui est encore plus frap-

(*) Il y a des sérums de tuberculeux qui ne réagissent qu'avec l'antigène protéidique et d'autres, qui ne fixent le complément qu'en présence d'antigène lipoïdique. Ces faits qui sont décrits dans notre publication avec W. SCHAEFER (*Annales de l'Institut Pasteur*, 53, 72 (1934)), plaident aussi en faveur de l'existence d'anticorps antiprotéidiques individuels.

S'il paraît ainsi être établi que la spécificité des antigènes protéidiques est différente de celle des antigènes lipoïdiques, l'étude de la spécificité des anticorps ne renseigne pas à coup sûr sur la nature des groupements fixateurs. En effet, il n'est pas impossible que la spécificité des haptènes soit modifiée par leur support et qu'ainsi un même haptène attaché à des supports différents puisse donner naissance à des anticorps différents.

TABLEAU XV

Comparaison de l'activité haptène des polyholosides tuberculiniques à celle des protéides vis-à-vis de différents anti-sérums.

a) Dans une première série d'expériences, nous avons ajouté à des doses décroissantes d'antisérums, des doses constantes d'antigènes (0 cm ³ 25 d'une solution à 1 p. 1.000). La fixation du complément fut effectuée en présence de 2,5 doses d'alexine. Les chiffres sont exprimés en unités d'alexine fixées par 1 cm ³ des différents antisérums.						
	Cheval anti-B. C. G.		Lapin anti-protéides		Lapin anti-lipoides	
	N° 65	N° 66	B. 19	B. 21	B. 13	B. 14
Polyholosides 1 . . .	80	110	100	80	0	0
Protéides	160	500	160	200	0	0

Les protéides employés sont les protéides tuberculiniques brutes contenant un mélange de polyholosides et de protéides.

b) Dans une deuxième série d'expériences, nous avons ajouté à des doses constantes d'antisérums (0 cm ³ 25 au 1/4) des doses décroissantes d'antigènes, en partant toujours de solutions à 1 p. 1.000 de ceux-ci. Les chiffres sont exprimés en poids minimum d'antigènes qui ont dévié 2,5 doses d'alexine.							
	Cheval anti-B. C. G			Lapin anti-protéides		Lapin anti-lipoides	
	64	65	66	B. 19	B. 21	B. 13	B. 14
Polyholoside 1. . .	0	1/108 à 1/320	—	1/1.080	1/1.000	0	0
Polyholoside 2. . .	0	1/128	—	—	1/500	—	0
Polyholoside 3. . .	—	1/64	1/32	1/16	—	—	0
Polyholoside 5. . .	0	1/32	—	—	1/2.000	0	—
Protéides complets	0	1/36	1/32	1/16	1/32	—	—
		à 1/64	—	à 1/1.000	à 1/1.000	0	0
Protéides purifiés.	—	0 à 1/64	—	1/108	0	0	0
Antigène méthyl- lique	1/270	1/270	—	—	0	1/150	1/200

pant, son activité vis-à-vis de ces deux sérums se trouve être exactement dans le même rapport que pour les protéides. On obtient exactement les mêmes résultats lorsqu'on examine la

teneur de ces différents sérums en anticorps protéidiques et polyholosidiques (doses décroissantes d'antisérum et dose constante d'antigène). Dans toutes ces expériences on trouve que l'activité du polyholoside est à peu près la même que celle des protéides brutes et que l'activité des protéides sans polyholosides est un peu plus faible (*) (voir aussi tableau n° XIII, p. 92).

Ces faits curieux nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'activité fixatrice du complément des protéides et des polyholosides n'est due ni aux protéides, ni aux polyholosides proprement dits, mais à une même impureté adsorbée par les deux.

Tout d'abord les polyholosides ne contiennent pas de protéides, ou n'en contiennent que des traces infimes. Les protéides purifiés ne peuvent contenir d'autre part qu'au maximum 6 p. 100 d'impuretés non azotées (**). Comme l'activité sérologique des deux préparations est à peu près la même, le protéide ne réagit pas par le polyholoside et le polyholoside ne réagit pas par le protéide. Mais s'ils sont deux antigènes différents il est très peu probable qu'ils puissent donner naissance à la même quantité d'anticorps dans deux préparations aussi différentes que des bacilles vivants et des protéides de leur milieu de culture. Notre hypothèse a ainsi beaucoup de chance de correspondre à la réalité et elle fut déjà vérifiée par les résultats du fractionnement physico-chimique des polyholosides (***).

(*) Parfois les protéides purifiés sont complètement inactifs du point de vue sérologique (voir à ce sujet l'objection page 97).

(**) Le protéide purifié contient, en effet, 14,7 p. 100 d'azote et comme un protéide animal pur contient à peu près 15,5 p. 100 d'azote, ce chiffre correspond à une teneur en protéide de 94 p. 100.

(***) Il se peut que les protéides possèdent d'autres fonctions antigéniques que l'haptène commun avec les polyholosides, mais dans ce cas ce dernier prédomine et masque les autres fonctions antigéniques. Naturellement, plusieurs anticorps peuvent coexister dans les sérums et les comparaisons quantitatives ne donnent des renseignements que sur la nature de celui qui prédomine.

Fractionnement physico-chimique des polyholosides et activité fixatrice des différentes fractions.

Nous avons effectué une précipitation fractionnée des polyholosides par l'alcool méthylique et nous avons trouvé que l'activité fixatrice des différentes fractions n'est pas du tout comparable. Tandis que la majeure partie (94 à 95 p. 100) du polyholoside, précipitant à des concentrations relativement faibles en alcool méthylique (jusqu'à 50 p. 100), est très peu actif ou même inactif, à des concentrations plus élevées d'alcool méthylique (entre 50 et 80 p. 100) on précipite une fraction relativement peu abondante (4 à 5 p. 100), mais bien plus active.

Toutes nos expériences de fractionnement furent effectuées sur des solutions à 1 p. 100 des polyholosides. Dans des expériences préliminaires nous avons déterminé les concentrations d'alcool méthylique pour lesquelles des fractions d'activité fixatrice différente peuvent être obtenues. Nous avons vu que la majeure partie des polyholosides précipite au-dessus d'une concentration de 30 p. 100 d'alcool méthylique (*), mais qu'il faut aller jusqu'à une concentration de 50 p. 100 pour précipiter toujours la totalité des polyholosides inactifs. Entre 50 et 85 p. 100 pratiquement la totalité de l'activité précipite et il ne reste dans les eaux-mères que des traces de substances actives.

La méthode de fractionnement que nous avons finalement adoptée, était la suivante : Un poids connu de polyholosides fut dissout dans de l'eau distillée à l'aide de quelques gouttes de soude N, puis la solution fut neutralisée et ajustée à une concentration de 1 p. 100. A cette solution nous avons ajouté un volume égal d'alcool méthylique anhydre, puis nous avons éliminé le précipité par centrifugation et nous avons lavé celui-ci à l'alcool méthylique. Le précipité fut dissout de nouveau dans l'eau, et précipité par volume égal d'alcool méthylique, enfin lavé à l'alcool méthylique à 50 p. 100, puis à l'alcool méthylique absolu et séché dans le vide sulfurique (polyholoside n° 1).

(*) Les concentrations d'alcool méthylique sont toujours exprimées en volumes d'alcool méthylique absolu ajouté p. 100 du volume d'eau.

Toutes les eaux-mères réunies, furent presque complètement évaporées dans le vide à basse température, puis le résidu fut repris et complété au 1/10^e du volume primitif de la solution polyholosidique. A cette solution légèrement opalescente, nous avons d'abord ajouté son volume d'alcool méthylique et nous avons éliminé par centrifugation une première fraction qui fut lavée à l'alcool à 50 p. 100, puis à l'alcool méthylique absolu et séchée dans le vide sulfurique (polyholoside n° Ia). Aux eaux-mères et aux eaux de lavage réunies nous avons ajouté un excès d'alcool méthylique et nous avons éliminé une dernière fraction (polyholosides n° II) qui fut lavée à l'alcool méthylique, puis séchée dans le vide sulfurique. Les eaux-mères finales furent enfin concentrées dans le vide, complétées à un volume connu, puis essayées du point de vue de la fixation du complément.

Les résultats de quelques-unes des déterminations sérologiques effectuées avec les différentes fractions, sont reproduits dans le tableau n° XVI. En observant ces résultats la première conclusion qui se prête à l'esprit est que la substance active est un polyholoside particulier qui ne constitue qu'une faible fraction (4 p. 100) des polyholosides totaux. En effet, cette fraction faible entraîne pratiquement la totalité de l'activité fixatrice. Elle est d'ailleurs constituée par un polyholoside qui réduit comme 90 p. 100 de son poids de glucose. Cependant, si la substance active est un polyholoside, ce polyholoside a des propriétés physiques tout à fait particulières. Tout d'abord une impureté entraînée par le polyholoside actif, est aussi, active que ce polyholoside (voir page précédente et tableau n° XVI, expérience n° 5), puis les protéides exempts de polyholosides sont souvent aussi actifs que les polyholosides eux-mêmes (*).

(*) Parfois les protéides purifiés, débarrassés de polyholosides, sont complètement inertes du point de vue fixateur, aussi bien vis-à-vis des sérums de chevaux anti-B. C. G. que vis-à-vis des sérums antiprotéidiques de lapins (voir tableau n° XVI, expériences 4 et 5). La cause exacte de cette inconstance du comportement sérologique des protéides nous échappe complètement, mais elle peut se trouver dans les conditions purement accidentelles dont dépendent souvent les phénomènes d'adsorption. Ce fait prouve cependant que l'activité haptène des protéides ne dépend que d'une impureté adsorbée par eux. Le rôle prédominant des « impuretés », sur lequel est basée notre conception personnelle, devient ainsi manifeste même pour les antigènes protéidiques.

TABLEAU XVI

Fractionnement des polyholosides tuberculiniques et activité fixatrice des différentes fractions obtenues.

Le fractionnement fut effectué par l'alcool méthylique à des concentrations variables. Les fractions furent séchées, puis dissoutes dans de l'eau physiologique à 9 p. 1.000 en une solution à 1 p. 1.000. La réaction de déviation du complément fut effectuée en présence de 0 cm³ 25 de sérum de cheval anti-B. C. G. au quart ou de sérum antiprotéidique de lapin au même taux et de 0 cm³ 25 de dilutions variables des antigènes. Les chiffres expriment les poids minima des différents antigènes qui ont encore fixé 2,5 unités d'alexine.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES :

1) *Polyholoside n° 1.* Sérums de cheval anti-B. C. G. 65.

	Polyholoside total	Fraction obtenue pour une concentration d'alcool méthylique de		
		0 0/0	0 à 32 0/0	32 à 70 0/0
Activité fixatrice	1/200	1/16	1/32	1/500
Poids p. 100 de polyholoside.	100	19	56	25

2) *Polyholoside n° 2.* Sérum de cheval anti-B. C. G. 65.

	Fraction obtenue pour une concentration d'alcool méthylique de		
	0 à 40 0/0	40 à 70 0/0	70 à 85 0/0
Activité fixatrice	1/64	1/4.100	1/2 050
Poids p. 100 de polyholoside	59,9	4.6	7.6
Activité fixatrice vis-à-vis du sérum anti-protéidique de lapin.	—	1/2.050	—

3) *Polyholoside n° 3.* Sérum de cheval anti-B. C. G. 65.

	Fraction obtenue pour une concentration d'alcool méthylique de	
	0 à 40 0/0	40 à 85 0/0
Activité fixatrice	1/32	1/32
Poids p. 100 de polyholoside	75	25

Comme nous voyons une première précipitation à une concentration d'alcool méthylique de 40 p. 100 n'élimine pas toujours les fractions inactives.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES :

4) Polyholoside n° 5.

Activité fixatrice en présence de sérum	Protéides sans polyholosides	Polyholoside complet	Fraction précipitant pour une concentration d'alcool méthylique de		
			0 à 50 0/0	50 à 85 0/0	reste (*)
Anti-B. C. G. 65. . .	—	1/32	0	1/256	1/16
Anti-B. C. G. 66. . .	—	1/16	0	1/256	1/16
Anti-prot. 19 . . .	0	1/32	—	1/320	—
Poids p. 100 de polyholoside . . .	—	100	96	4	traces
Pouvoir réducteur.	—	87	87	90	—

5) Polyholoside n° 6.

Activité fixatrice en présence de sérum	Protéides sans polyholosides	Fraction précipitant pour une concentration d'alcool méthylique de			
		0 à 50 0/0	0 à 50 0/0	50 à 85 0/0	reste (*)
Anti-B. C. G. 65. . .	0	1/8	1/532	1/532	1/16 cm ³
Anti-prot. 19, dilué au 1/10 . . .	0	0	1/128	1/128	1/16 cm ³
Poids p. 100 de polyholoside . . .	—	94,5	1,65	3,85	traces

Dans ces deux dernières expériences, la première fraction fut précipitée deux fois de suite et la deuxième fraction obtenue des deux eaux-mères réunies. Dans la dernière expérience nous avons réuni les deux eaux-mères de précipitation de la première fraction et nous les avons concentrées à un faible volume dans le vide, puis nous avons ajouté volume égal d'alcool méthylique absolu. Un précipité est apparu qui constitue la deuxième fraction précipitant pour une concentration d'alcool méthylique de 50 p. 100 et qui est aussi active du point de vue fixateur que la fraction qui précipite entre 50 et 85 0/0.

(*) Le reste est constitué par la fraction qui reste en solution en présence d'une concentration d'alcool méthylique de 85 p. 100. Cette fraction fut concentrée dans le vide, puis complétée à un volume qui correspond à 40 milligrammes de polyholosides initiaux pour 1 cm³. Elle ne contenait donc que des traces de substances actives et elle fut rejetée.

La substance active doit donc être excessivement adsorbable et il est plus logique d'admettre que le fait que l'on arrive à la concentrer dans quelques fractions assez bien caractérisées, est dû à l'existence de quelques complexes déterminés entre l'haptène proprement dit et des supports protéidiques ou polyholosidiques.

***Fraction anaphylactogène des protéides tuberculiniques bruts ;
complexité antigénique de ceux-ci.***

Les protéides tuberculiniques contiennent au moins deux haptènes différents, l'haptène lipoidique et l'haptène protéidique proprement dit. Ce dernier paraît accompagner sa fraction glucidique, comme sa fraction protéidique. Il était intéressant de savoir comment les différentes fractions se comportent vis-à-vis des cobayes sensibilisés par des protéides tuberculiniques. Nous avons injecté dans le derme de plusieurs cobayes, dont la peau réagissait bien aux protéides brutes, *a)* les protéides exempts de polyholosides ; *b)* une émulsion aqueuse de l'extrait alcoolique des protéides et *c)* les polyholosides exempts d'azote. Le tableau n° XVII, montre les résultats obtenus.

TABLEAU XVII

Activité réactionnelle des différentes fractions des protéides tuberculiniques vis-à-vis de la peau des cobayes anaphylactiques.

Réactions intradermiques observées 5 heures après l'injection intracutanée de 0,1 cm ³ : <i>a)</i> d'une solution à 4 p. 1.000 de protéides purifiés ; <i>b)</i> d'une solution à 1 p. 1.000 des polyholosides et <i>c)</i> d'une émulsion aqueuse de l'extrait alcoolique des protéides, dont chaque centimètre cube correspond à 5 milligrammes de ces derniers.		
Protéides purifiés	Polyholosides	Extrait alcoolique
+++	0	0

Les protéides proprement dits, seuls ont provoqué des réactions intradermiques chez l'animal anaphylactique. Comme l'extrait alcoolique est inactif, ce n'est certainement pas l'antigène lipoidique qui a rendu anaphylactique les cobayes. Les polyholosides étaient cependant inactifs aussi et ces derniers semblent contenir le même haptène fixateur du complément que les protéides. Il faudrait donc admettre que les protéides contiennent en dehors de l'antigène lipoidique et l'antigène protéidique, un groupement anaphylactogène particulier. Nous voyons ainsi combien complexe est la structure antigénique des protéides tuberculiniques, ceux-ci contiennent en effet, au moins deux différents antigènes fixateurs du complément, un groupement anaphylactogène et éventuellement de la tuberculine. D'ailleurs c'est un fait qui découle directement de la complexité de la structure physico-chimique des protéides naturels et devrait toujours être pris en considération lorsqu'on examine les propriétés biologiques de ceux-ci.

Résumé et rappel des conclusions.

Nature de l'antigène protéidique.

Les protéides tuberculiniques contiennent de l'antigène lipoidique, cependant ils ne fixent pas le complément en présence d'anticorps antilipoidiques purs. Leurs propriétés antigéniques dépendent de l'existence d'un antigène protéidique différent de l'antigène lipoidique. Cet antigène est un haptène fixateur du complément vis-à-vis des sérums de tuberculeux, les bacilles tuberculeux vivants engendrent donc dans l'organisme animal des anticorps antiprotéidiques spécifiques.

Les protéides tuberculiniques contiennent des polyholosides. Ceux-ci sont aussi des haptènes fixateurs du complément vis-à-vis des sérums de tuberculeux, mais ils réagissent aussi avec des sérums antiprotéidiques expérimentaux. La teneur des différents sérums en anticorps, réagissant avec les protéides et leur fraction glucidique, est dans un rapport fixe et les protéides exempts de glucides réagissent encore avec ces sérums. Il est ainsi vraisemblable que l'haptène protéidique soit une ou plusieurs impuretés absorbées par les protéides et par les

polyholosides. En fractionnant ces derniers par l'alcool méthylique, on arrive d'ailleurs à débarrasser la presque totalité des polyholosides pratiquement de toute activité fixatrice et de concentrer celle-ci dans une toute petite fraction qui est à peu près 20 fois plus active que les polyholosides primitifs. Cette fraction active paraît être un polyholoside particulier, cependant celui-ci n'est pas l'unique support de l'activité fixatrice parce que d'autres fractions accessoires peuvent être aussi actives que lui.

On pourrait expliquer ces faits en admettant l'existence dans les protéides tuberculiniques brutes de deux ou trois substances actives différentes, fixatrices du complément. Dans ce cas il faudrait cependant admettre aussi que les anticorps qui correspondent à ces différents haptènes sont dans les différents sérums dans des proportions fixes et invariables, ce qui est très peu vraisemblable. Le fait que parfois les protéides purifiés sont dépourvus de toute activité fixatrice aussi bien vis-à-vis des sérums anti-B. C. G. que vis-à-vis des sérums antiprotéidiques, plaide aussi contre cette façon de voir.

Il est ainsi infiniment plus probable que les protéides comme les polyholosides, ne possèdent qu'un seul et unique haptène, qui est une impureté adsorbée par ces corps, épousant leurs propriétés de solubilité. Il se peut d'ailleurs que cette impureté éminemment adsorbable, contracte déjà dans les cellules vivantes des relations plus étroites avec un polyholoside particulier.

Les propriétés physico-chimiques de l'haptène protéidique deviennent ainsi comparables à celles des diastases et de la tuberculine. C'est une substance qui doit supporter une activité énorme pour un poids infime et comme elle n'a pas de propriétés de solubilité tranchées, elle devient un *corps fantôme*.

CHAPITRE VI

ANTIGÈNE LIPOÏDIQUE

Quelques propriétés physico-chimiques de l'antigène lipoiidique contenu dans les extraits aqueux des bacilles tuberculeux ()*.

Considérations d'ordre général.

L'extrait lipoiidique des bacilles de Koch est antigène *in vivo* et *in vitro* : d'une part, il provoque la formation d'anticorps décelables par la déviation du complément et, d'autre part, il fixe le complément en présence des sérums de tuberculeux (1) (2). Cet extrait lipoiidique contient donc un antigène qui paraît être complet (**) et la détermination de la constitution chimique de celui-ci est un problème d'une importance capitale. Les antigènes lipoiidiques sont, en effet, des substances tout à fait particulières ayant comme caractère commun d'être solubles dans l'alcool et on ne peut pas savoir jusqu'à ce jour, s'ils sont des vrais lipides ou seulement des impuretés adsorbées par ces derniers.

L'antigène lipoiidique peut être extrait des bacilles de Koch sous une forme soluble dans l'eau et les expériences de fractionnement relatées ci-après, furent effectuées avec cette forme

(*) Ce travail fut effectué en collaboration avec C. NINNI.

(1) K. MEYER. *Zeitschr. fuer Immunitätsf.*, 7, 732 (1910); 11, 244 (1911); 14, 355 et 15, 245 (1912).

(2) BOQUET et NÈGRE. *Ann. Inst. Pasteur*, 35 (1921), 37 (1923).

(**) De nombreux auteurs prétendent que les antigènes lipoiidiques ne sont antigènes qu'à la faveur de traces de protéides entraînés, cependant, en ce qui concerne l'antigène lipoiidique des bacilles tuberculeux, ce ne semble pas être le cas.

de l'antigène lipoidique. Nous avons en effet supposé qu'il serait intéressant d'entreprendre l'étude de cet antigène dans un milieu relativement pauvre parce que dans l'extrait alcoolique ou l'extrait lipoidique total des bacilles l'antigène est noyé dans un mélange de graisses excessivement complexe.

L'antigène lipoidique sous sa forme hydrosoluble.

Caractères généraux.

Les bacilles de Koch vivants cèdent facilement à l'eau distillée ou à l'eau salée, dans laquelle ils macèrent, de l'antigène lipoidique. Ces extraits, filtrés sur bougie de Chamberland, évaporés à sec et repris par l'alcool, fixent, en effet, le complément en présence des sérums de tuberculeux.

Deux points importants caractérisent l'antigène lipoidique contenu dans ces filtrats : 1° l'antigène lipoidique s'y trouve sous une forme soluble dans l'eau, mais après chauffage en présence d'alcool, il perd sa solubilité dans l'eau (1) ; 2° l'antigène lipoidique des filtrats ne fixe que très peu le complément ou pas du tout, il ne devient un bon antigène fixateur qu'après l'évaporation des filtrats aqueux et la dissolution des résidus dans l'alcool (2).

A priori il est vraisemblable de supposer que l'antigène lipoidique des filtrats se trouve fixé dans un complexe à d'autres substances qui l'accompagnent dans les extraits aqueux des bacilles. Cette hypothèse pourrait expliquer à la fois sa solubilité dans l'eau, par une sorte d'entraînement colloïdal, et son inactivité dans la fixation du complément en présence d'anticorps spécifiques.

Pour élucider ces problèmes nous avons étudié séparément les relations entre l'antigène lipoidique et les protéides, en particulier les protéides tuberculiniques, et l'évolution de celui-là au cours du fractionnement des filtrats.

(1) M. A. MACHEBŒUF, G. SANDOR et C. NINNI. *C. R. Acad. ès Sciences*, 195, 275 (1932).

(2) C. NINNI. *Annales de l'Institut Pasteur*, 49, 186 (1932).

***Relations entre les protéides bacillaires
et l'antigène lipoiidique.***

Nous serons très brefs sur ce sujet, que nous avons décrit, en effet, en détail dans le chapitre qui précède. Nous avons vu que les protéides tuberculiniques contiennent de l'antigène lipoiidique et que celui-ci se trouve dans un état caché, il ne réagit en effet avec les anticorps antilipoiidiques qu'après qu'il a été extrait des protéides par de l'alcool (pp. 95).

Le complexe : antigène lipoiidique + protéides est, d'autre part, assez stable, l'alcool froid ne suffit pas, en effet, pour le détruire entièrement.

Il est ainsi certain que l'entraînement de l'antigène lipoiidique dans l'eau dépend, tout au moins en partie, de la formation de complexes colloïdaux avec les protéides.

***L'antigène lipoiidique des eaux de macération
des bacilles vivants.***

Dans une deuxième série d'expériences nous avons cherché à voir si le protéide constitue l'unique support colloïdal de l'antigène lipoiidique et si d'autres colloïdes biologiques ne peuvent pas l'être aussi. Ces expériences furent effectuées sur un matériel un peu particulier, dont la méthode d'obtention était la suivante :

Nous avons toujours employé des bacilles de Koch (souche bovine VALLÉE, cultivée sur milieu de SAUTON) vivants, filtrés sur papier-filtre, puis lavés à l'eau distillée et repris enfin dans celle-ci. Les bacilles furent conservés avec leur eau de macération à la glacière pendant une semaine et les mélanges furent fréquemment agités ; au bout de ce temps ils furent filtrés sur papier, puis sur bougie de CHAMBERLAND.

Les extraits ainsi obtenus, contenaient des traces de protéides, de polyholosides et de substances lipoiidiques ; ils contenaient d'autre part un antigène fixateur assez actif après évaporation et reprise du résidu dans l'alcool.

Fractionnement physico-chimique des filtrats et activité fixatrice des différentes fractions.

1° *Entraînement de l'antigène lipoidique par les protéides.* — A un volume connu de filtrat nous avons ajouté 1 $\frac{5}{100}$ de son volume d'acide trichloracétique à 40 p. 100, puis nous avons éliminé le précipité de protéides par centrifugation. Le précipité ayant été extrait par l'alcool à chaud, nous avons déterminé l'activité fixatrice de l'extrait alcoolique. Parallèlement nous avons déterminé l'activité fixatrice de l'extrait alcoolique du filtrat primitif. Voici les résultats obtenus.

		Activité fixatrice
Protéides		6 unités
Filtrat		100 »
La réaction de déviation du complément fut effectuée par la méthode de CALMETTE et MASSOL (doses variables d'alexine) vis-à-vis d'un sérum de cheval anti-B. C. G.		

Il ressort de ce tableau que dans nos filtrats, les protéides n'entraînent qu'une petite fraction de l'antigène lipoidique. La majeure partie de celui-ci doit donc avoir d'autres supports que des protéides, ou exister à l'état libre. Les expériences relatées ci-après, permettent de répondre dans une certaine mesure à cette question.

2° *Fractionnement par l'application successive de différents réactifs défécants.* — La méthode que nous avons adoptée dans cette étude, pourrait être appelée une « méthode de défécation fractionnée ». Des méthodes analogues, basées sur le même principe, furent d'ailleurs déjà appliquées par d'autres auteurs en particulier pour le fractionnement des vitamines (1) (2).

On ajoute successivement aux solutions que l'on veut fractionner, des réactifs qui ont la propriété de précipiter les substan-

(1) H. CHICK. *Biochem. Jour.*, 23, 504 (1929).

(2) KINNERSLEY et PETERS. *Biochem. Jour.*, 21, 777 (1927).

ces de poids moléculaire élevé et que l'on qualifie pour cette raison de défécants. On peut choisir la série de ces réactifs de façon à obtenir un fractionnement suivant les poids moléculaires et les tendances polaires des constituants des solutions complexes.

Nous avons choisi comme défécants basiques, deux défécants plombiques d'activité fort différente. L'acétate de plomb en solution neutre qui est relativement peu actif (il précipite les protéides et les polyholosides très complexes, type amidon) et l'hydroxyde de plomb en solution ammoniacale qui est un agent précipitant excessivement actif des substances complexes (les polyholosides moins complexes, type glycogène, un grand nombre de protides plus simples, la plupart des pigments, etc.).

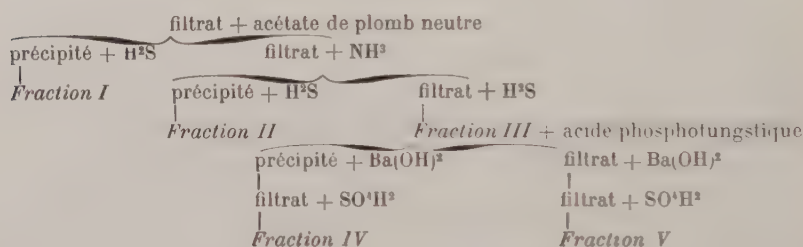
Ayant étudié précédemment l'action de l'acide trichloracétique, nous nous contentons d'exposer ici celle de l'acide phosphotungstique qui est le précipitant de prédilection des protéides et des protides plus simples, tels que ceux qui constituent les mélanges de digestion peptique (albumoses et peptones).

Description des expériences.

A un volume connu de notre extrait, nous avons ajouté un excès d'une solution concentrée d'acétate de plomb neutre, après avoir légèrement acidifié par l'acide acétique dilué ; un précipité floconneux, fin, est apparu. Nous avons centrifugé, puis ajouté au filtrat décanté, goutte à goutte de l'ammoniaque concentré jusqu'à la précipitation complète de l'hydroxyde de plomb. Celui-ci et les sels plombiques des substances complexes furent séparés par centrifugation. Les précipités furent mis en suspension dans l'eau, puis soumis, comme le filtrat déféqué, à l'action d'un courant d'acide sulfhydrique pendant 30 à 40 minutes. Les polyholosides et les protides précipités sont ainsi remis en solution et le plomb est éliminé sous la forme de sulfure. Les trois solutions furent filtrées, puis concentrées dans le vide pour chasser l'excès d'acide sulfhydrique.

Une fraction du filtrat obtenu après précipitation par l'hydroxyde de plomb, fut évaporée et reprise par l'alcool pour la détermination de l'activité fixatrice. La majeure partie fut pré-

cipitée par un excès d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100 après acidification nette par l'acide sulfurique. Un précipité est apparu qui fut séparé. Nous avons ensuite mis en suspension dans l'eau le précipité séparé ; celui-ci fut alcalinisé nettement, ainsi que le filtrat, par une solution saturée d'hydroxyde de baryum. L'action de l'hydroxyde de baryum fut prolongée pendant plusieurs heures, le filtrat étant fréquemment agité. Les substances précipitées par l'acide phosphotungstique, furent ainsi remises en solution et l'hydroxyde de baryum précipita l'acide phosphotungstique. L'excès d'hydroxyde de baryum fut enfin éliminé par l'acide sulfurique dilué ajouté jusqu'à neutralité. Le fractionnement est schématisé ci-dessous :



Nous avons donc obtenu 5 fractions et nous avons déterminé l'activité haptène de leurs extraits alcooliques vis-à-vis d'un sérum anti-B. C. G. du cheval. Les résultats sont reproduits dans le tableau n° XVIII.

Tous les précipités entraînent ainsi une partie de l'antigène fixateur, mais une partie importante de celui-ci reste toujours dans les filtrats. Il serait absurde d'admettre que de différents antigènes lipoprotéidiques, protéidiques, polyholosidiques, protidi-ques, puissent exister. La conclusion qui s'impose, est donc la même que celle que nous avons fait au sujet de la tuberculine et de l'antigène protéidique. L'antigène lipoprotéidique est une substance excessivement adsorbable qui épouse les propriétés de solubilité des autres substances contenues dans son ambiance.

TABLEAU XVIII

Activité haptène des extraits alcooliques obtenus à partir des différents constituants complexes des filtrats bacillaires.

Les extraits alcooliques furent toujours obtenus par évaporation à sec en présence d'un excès d'alcool à chaud et par épuisement des résidus par de l'alcool chaud. Les extraits furent filtrés sur papier-filtre serré, puis complétés tous à un même volume final avec de l'alcool et dilués au 1/10^e avec de l'eau physiologique à 9 p. 1.000. Nous avons effectué des réactions de fixation du complément par la méthode de CALMETTE et MASSOL et nous avons calculé le nombre d'unités d'alexine fixées par 1 cm³ de chacun des extraits.	
Désignation des fractions	Activités fixatrices
Filtrat primitif	100 unités
1) Précipité par l'acétate de plomb.	10 »
2) Précipité par PbOH + NH ³	10 »
3) Filtrat déféqué	50 »
4) Précipité par l'ac. phosphotungstique	20 »
5) Filtrat résiduel	20 »

Résumé et rappel des conclusions.

L'antigène lipoiidique des bacilles tuberculeux est, en définitive, insoluble dans l'eau, mais il passe relativement très facilement dans les extraits aqueux parfaitement limpides des bacilles. De ceux-là il ne précipite que partiellement avec les protéides, et les polyholosides et les protides plus simples en entraînent d'autres fractions à peu près équivalentes.

Pour expliquer ces faits, il faut admettre que l'antigène lipoiidique est une substance excessivement adsorbable et, comme son adsorbabilité est d'un caractère absolument indifférent, devient un corps fantôme épousant les propriétés de solubilité des autres substances contenues dans son ambiance. Celles-là sont donc les supports colloïdaux de l'antigène lipoiidique et celui-ci ne fait entre eux aucun choix. Nous avons observé des faits analogues dans le cas des diastases (supports colloïdaux de nature variable), mais nous avons mentionné que dans la

matière vivante les supports des diastases sont peut-être plus stables. Il est intéressant de noter à ce sujet que l'antigène lipoidique paraît être uni très solidement aux protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles et ce fait nous montre que tout au moins certains complexes d'adsorption de l'antigène lipoidique peuvent être, eux aussi, assez stables.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS AU SUJET DES ANTIGÈNES DES BACILLES TUBERCULEUX

Structure antigénique du bacille de Koch.

Nous avons décrit les propriétés physiques prédominantes de trois antigènes importants des bacilles tuberculeux (tuberculine, antigène protéidique et antigène lipoïdique). Ce travail fut effectué en associant les méthodes de recherche biologique avec celles de la chimie-physique ; il doit être considéré comme une introduction indispensable à des études chimiques ultérieures.

Y a-t-il des relations physico-chimiques ou biologiques entre les antigènes que nous avons décrits ? A ce sujet nous ne pouvons pas encore dire grande chose. Certains faits semblent cependant assez bien établis. En particulier nous avons vu combien il est facile d'extraire par l'alcool froid de la tuberculine des bacilles vivants. Dans les mêmes conditions on extrait une grande quantité de substances lipoïdiques et de l'antigène lipoïdique. Contrastant avec cette facilité d'extraction de certains lipides par les solvants organiques, l'extraction de principes azotés par de l'eau s'effectue très mal.

Extraction de principes azotés des corps bacillaires ().*

Les bacilles de KOCH vivants (souche bovine VALLÉE, cultivée pendant 6 semaines sur milieu de SAUTON) furent séparés de leur milieu de culture par filtration sur papier et lavage pro-

(*) Travail effectué en collaboration avec J. J. PÉREZ.

longé à l'eau distillée. Les bacilles lavés, furent tués et déshydratés par l'alcool absolu à basse température (-10°) (*), puis dégraissés à l'éther (**). Les corps bacillaires furent ensuite extraits par des tampons de pH variables et de différentes concentrations salines (***). Nous avons étudié l'influence de la répétition et de la durée des extractions et de la température. Nous réunissons dans le tableau ci-contre quelques-uns de nos résultats.

Nous voyons que, si on peut extraire parfois des quantités d'azote assez considérables, l'azote protéidique proprement dit n'en constitue en général qu'une faible proportion (1/4 à 1/10^e de l'azote total). La quantité d'azote extrait augmente continuellement et très lentement avec la durée et cette augmentation est indépendante de la répétition des extractions. L'extraction paraît aboutir, d'autre part, à basse température, à une proportion plus élevée d'azote protéidique qu'aux températures plus élevées.

Tous ces faits font supposer que les protéides bacillaires doivent être fixés d'une façon énergique dans la profondeur des corps bacillaires à d'autres constituants cellulaires et que leur mise en liberté est liée à des processus physico-chimiques complexes, peut-être à des processus diastasiques (****).

Les protéides du corps bacillaire que nous avons obtenus, étaient tous très peu actifs au point de vue tuberculinique; ceux que l'on obtient après broyage des corps bacillaires en présence de sable et leur agitation avec des billes de verre, paraissent être, par contre, de meilleures tuberculines.

(*) Comme HARDY et GARDINER (*Journ. of Physiol.*, 40 (1910); *Proc.*, 68) l'ont démontré, dans ces conditions il n'y a pas de dénaturation sensible des protéides.

(**) Pour traiter des grandes quantités de bacilles vivants, nous nous sommes servis d'un grand entonnoir métallique qui fut placé dans une grande cloche en tôle. Le fond de la cloche fut muni de coton sur lequel nous avons placé du mélange réfrigérant. Les filtrations et les lavages furent effectués sur des papiers-filtres peu serrés avec des plis.

(***) Pour effectuer nos expériences avec des quantités relativement faibles de bacilles vivants, nous nous sommes servis de filtres d'Iéna transformés en flacons et munis d'un robinet avec rodage sur la partie située au-dessous de la plaque filtrante; au-dessus de ce robinet on pouvait appliquer une cloche de verre à l'aide d'un bouchon percé qui permettait de recevoir des mélanges réfrigérants.

(****) Remarquons que nos extraits ne contenaient pas de protéases.

TABLEAU XIX

*Extraction de principes azotés des bacilles tuberculeux tués par l'alcool et l'éther à basse température.***1^{re} EXPÉRIENCE. — Influence de la répétition des extractions à deux pH différents.**

La masse des bacilles est divisée en deux. Une partie est traitée par des solutions de phosphate de potassium M/15 de pH 4.3, contenant 3 p. 100 de chlorure de sodium, l'autre partie par des solutions de constitution identique, mais de pH 8.2. Les bacilles, conservés à la glacière, sont agités de temps à autre et la solution qui les baigne, est renouvelée après des durées bien déterminées. Les extraits prélevés sont filtrés sur filtre d'amiante (filtre de Serrz) et sur des volumes déterminés, on fait des dosages d'azote par la méthode de KJELDAHL; dans quelques-uns de ces filtrats on précipite les protéides par l'acide trichloracétique à 8 p. 100 et on dose l'azote contenu dans les précipités, parfois enfin on détermine le pouvoir réducteur par la méthode de G. BERTRAND après l'hydrolyse acide (acide sulfurique normal à 120° pendant une heure).

a) Extraction à la glacière, phosphate de potassium M/15 + NaCl 3 p. 100. pH 4.3. Expérience effectuée sur 1 gr. 95 de poids sec de microbes.

Durée de l'extraction	Volume	Teneur en Az	Az trichlor-acétique	Pouvoir réducteur après hydrolyse (exprimé en glucose)
20 heures	28 cm ³	0,12 p. 1.000	0,021 p. 1.000	0,86 p. 1.000
27 »	15 »	0,07 »	—	—
72 »	15 »	0,10 »	—	—
96 »	15 »	0,07 »	0,014 p. 1.000	—

b) Extraction à la glacière, phosphate de potassium M/15 + NaCl 3 p. 100. pH 8.2. Expérience effectuée sur 2 gr. 200 de poids sec de microbes.

Durée de l'extraction	Volume	Teneur en Az	Az trichlor-acétique	Pouvoir réducteur après hydrolyse (en glucose)
20 heures	30 cm ³	0,17 p. 1.000	0,05 p. 1.000	0,75 p. 1.000
27 »	15 »	0,20 »	—	—
72 »	15 »	0,22 »	0,10 p. 1.000	—
1 (*) »	27 »	0,08 »	—	—
96 »	40 »	0,08 »	—	—

(*) Le traitement par la solution tampon n'a duré dans ce cas qu'une heure, mais pendant ce temps les bacilles furent soumis à l'agitation continue.

2° EXPÉRIENCE. — Influence de la durée de l'extraction en présence et en l'absence de chlorure de sodium.

La masse des bacilles est divisée en deux parties qui sont traitées à la température de laboratoire par des solutions de phosphate de potassium M/15 de pH 8.8, mais l'une en présence et l'autre en l'absence de NaCl (3 p. 100). Les bacilles sont conservés pendant la durée de l'expérience en présence de la même solution et les différentes prises d'essai sont remplacées aussitôt par le même volume d'une solution de même composition ; par ces prélèvements les concentrations changent donc et, de ce fait, nous avons introduit des corrections dans les teneurs trouvées en différents constituants. Les méthodes employées furent déjà décrites précédemment.

a) Extraction à 20°, phosphate de potassium M/15 sans NaCl, pH 8.8. Volume employé pour l'extraction : 70 cm³ ; poids sec des microbes : 3 gr. 25.

Durée de l'extraction	Az total	Az trichloracétique
18 heures	0,24 p. 1.000	0,027 p. 1.000
25 »	0,27 »	0,029 »
48 »	0,29 »	—
96 »	0,35 »	0,034 p. 1.000

b) Extraction à 20°, phosphate de potassium M/15 + NaCl 3 p. 100, pH 8.8. Volume employé pour l'extraction : 100 cm³, poids sec des microbes : 4 gr. 51.

Durée de l'extraction	Az total	Az trichloracétique
1 h. 30 m.	0,06 p. 1.000	traces
2 h. 30 m.	0,06 »	traces
18 heures	0,17 »	0,011 p. 1.000
25 »	0,18 »	0,02 »
48 »	0,19 »	0,021 »
96 »	0,22 »	0,026 »

L'extraction augmente donc continuellement, très lentement, dans le temps et paraît être plus active en l'absence de chlorure de sodium.

Nous avons calculé :

a) La quantité totale de substances azotées extraites dans ces expériences des corps bacillaires, en multipliant le chiffre de l'azote total par 7 (donc en supposant que l'azote total contenu dans les extraits, est supporté par des protéides).

b) Le rapport de l'azote du précipité trichloracétique à l'azote total d'après la moyenne de plusieurs extraits obtenus à 4° et de plusieurs autres obtenus à 20°.

		Protides extraits p. 400 de corps bacillaires
1) A 4°, pendant 9 jours, pH 4,3, phosphate M/15 + NaCl 3 p. 100. Solvant renouvelé		2,6 p. 400
2) A 4°, pendant 9 jours, pH 8,2, phosphate M/15 + NaCl 3 p. 100. Solvant renouvelé		5,3 »
3) A 20°, pendant 4 jours, pH 8,8, phosphate M/15 + NaCl 3 p. 100. Solvant non renouvelé		3,4 »
4) A 20°, pendant 4 jours, pH 8,8, phosphate M/15 sans NaCl. Solvant non renouvelé.		5,4 »
		Azote du précipité trichloracétique
		Azote total
Extraits à 20°		11 p. 400
Extraits à 4°		26 »

Hypothèse sur la structure antigénique des bacilles de Koch.

Si nous comparons l'extraction relativement facile et rapide de l'antigène lipoidique et de la tuberculine des corps bacillaires qui accompagne l'entraînement de substances lipoidiques, à l'extraction lente et toujours faible des protéides bacillaires, nous pouvons admettre que la couche superficielle des corps bacillaires est constituée (*) surtout par certaines substances lipoidiques. Celles-ci tiennent adsorbées la tuberculine et l'antigène lipoidique. Cette hypothèse explique le rôle important que paraissent jouer ces deux principes dans l'infection bacillaire, étant donné qu'au cours des infections c'est par leur surface que les bacilles tuberculeux entreront en contact avec les humeurs et les cellules de l'organisme animal.

Pour expliquer le rôle antigène des protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles, il faut admettre que ces protéides sont excrétés aussi lorsque les bacilles tuberculeux vivent en parasites dans l'organisme infecté.

(*) On pourrait tout autant supposer l'existence de micelles lipo-protéidiques polarisées avec couche lipidique superficielle; cette supposition ne changerait cependant en rien notre raisonnement.

QUATRIÈME PARTIE

VUES THÉORIQUES SE RATTACHANT AU PROBLÈME DES ANTIGÈNES

CHAPITRE PREMIER

ANTIGÈNES ET DIASTASES

1. — *Place occupée par les antigènes et les diastases dans les principes immédiats.*

L'exemple des antigènes des bacilles tuberculeux nous a permis d'établir un rapprochement intéressant entre les antigènes des microbes pathogènes et les diastases. Nous avons vu que tous ces principes s'adsorbent, apparemment sans aucune prédilection, à toutes les substances complexes contenues dans leur ambiance. Ils peuvent nous paraître ainsi comme étant des protéides, des polyholosides ou des graisses et leurs propriétés physico-chimiques propres s'évanouissent complètement.

Sont-ils des activités ou des substances particulières? Cette question que nous trouvons posée dans certains livres, ne prête qu'à des confusions. Les activités sont toujours supportées par des substances, seulement celles-ci peuvent les perdre sans présenter nécessairement des changements chimiques appréciables. Ainsi nous admettons que les antigènes et les diastases sont des substances particulières ayant un certain nombre de caractères communs qui permettent de les ranger dans un groupe particulier des principes immédiats. Tous les représentants de ce groupe seraient doués d'une adsorbabilité extraordinaire et d'une indifférence polaire totale (*). C'est la biologie qui nous autorise à définir ce groupe, tout autant qu'elle nous a autorisé, à un moment donné, à définir les

(*) Dans la théorie électro-chimique l'acidité ou la basicité sont dues à l'existence de charges électriques sur les molécules, celles-ci deviennent ainsi comparables à des particules électrisées ayant des pôles.

« lipoïdes » ou les vitamines. Le groupe des « corps fantômes » doit se trouver, en effet, par une nécessité physique quasi-absolue, à la surface cellulaire. Les « corps fantômes » sont très adsorbables, ils abaissent donc la tension superficielle et ils s'adsorbent aux surfaces. Etant donné qu'ils se trouvent à la surface cellulaire et qu'ils sont très adsorbables, ils doivent jouer un rôle très important dans les relations entre les cellules et leur ambiance et devenir des antigènes ou des diastases.

Quelle est la nature chimique de ces substances ? Nous ne pouvons rien dire de précis à ce sujet, pour le moment aucune n'est isolée et des difficultés extraordinaires s'opposent à leur fractionnement et purification. Cependant, leurs propriétés physiques particulières permettent d'avoir certaines présomptions concernant leur constitution. Une adsorbabilité de caractère indifférent exclut l'existence de groupements acides ou basiques. Les substances organiques les moins polaires sont les carbures d'hydrogène saturés, ceux-ci n'ont cependant aucune affinité pour l'eau, ni pour aucune des substances biologiques complexes. Il faudrait les chercher de préférence parmi les substances polycycliques (*), comme on en trouve dans les substances lipoïdiques (tels les stérols), ou peut-être des protides particuliers pourraient en être les représentants (protides avec noyaux pipérazidiques par exemple).

Quelle est la complexité de ces substances ? Il est fort probable qu'elles ne sont pas des colloïdes proprement dits, bien que certains ne puissent exister en présence de l'eau qu'à l'état micellaire (lipases végétales, antigènes lipoïdiques). En effet, nous avons vu que la tuberculine traverse les dialyseurs, il en est vraisemblablement de même pour un grand nombre de diastases qui s'inactivent au cours de la dialyse (**).

En partant de l'exemple des bacilles tuberculeux, nous

(*) Nous savons par exemple combien grande est l'adsorbabilité et l'activité superficielle des sels biliaires qui sont, pour ainsi dire, les types des substances polycycliques. Un caractère acide tranché permet cependant leur isolement.

(**) Un grand nombre de diastases (lipases, protéases, etc.) s'inactivent pendant la dialyse. Comme celles-là ne sont pas stables sans leur support colloïdal, il est vraisemblable que les substances actives traversent les dialyseurs et s'inactivent en l'absence de leur support.

nous sommes permis une généralisation qui pourrait paraître quelque peu excessive. Cependant pour les diastases cette généralisation s'impose d'après les travaux de WILLSTÄETTER (voir p. 14) et nous n'avons pas la prétention d'affirmer que tous les antigènes sont nécessairement des « corps fantômes ». Remarquons cependant que ce n'est pas impossible parce que les résultats des fractionnements physico-chimiques ne dépendent que des relations entre la substance active et son support colloïdal.

2. — *Relations entre les substances actives et leurs supports colloïdaux.*

Tout d'abord, nos substances actives ont nécessairement un support, mais ce fait peut être purement accidentel. La matière vivante et ses produits sont toujours constitués par un mélange de plusieurs substances chimiques, les substances excessivement adsorbables, sans caractère acide ou basique, sont donc nécessairement adsorbées par d'autres. Cette adsorption purement accidentelle paraît être le cas pour les antigènes du bacille de Koch que nous avons étudiés, et pour la plupart des diastases.

Les substances actives sont cependant, à un moment donné, adsorbées à la surface des cellules vivantes, où elles peuvent former des complexes assez stables avec d'autres constituants. Si ces complexes existent à l'exclusivité, ou si les substances actives sont dénaturées en quittant ces complexes, des polyholosides ou des protéides bien caractérisés peuvent être des antigènes ou des diastases. Nous rappelons les exemples démonstratifs de l'uréase ou de la pepsine cristallisée (p. 16) ; le protéide tuberculinique cristallisé de SEIBERT rentre peut être aussi dans ce cas. Ainsi il se peut que tous les protéides ou polyholosides antigènes ne soient que des complexes colloïdaux stables, formés à la surface des cellules vivantes entre une substance active et son support colloïdal.

Etant donné que dans les conditions naturelles la substance active n'existe jamais sans son rapport, celui-ci joue nécessai-

rement un rôle important dans l'existence de celle-là. Le support peut conditionner tout d'abord l'activité de la substance active. C'est le cas des diastases qui ne paraissent pas pouvoir exister sans leurs supports colloïdaux. Remarquons que les diastases possèdent un groupement catalytique, dont les antigènes ne disposent pas vraisemblablement, et il se peut que la stabilisation par le support intéresse ce groupement. Pour les antigènes, il est aussi généralement admis que leur activité est conditionnée par un support protéidique et que, sans celui-ci, ils ne peuvent pas donner naissance à des anticorps. Peut-être que cette deuxième règle peut souffrir d'exceptions (voir à ce sujet p. 29).

Le support pourrait intervenir d'autre part dans la spécificité de l'action de la substance active. Cette possibilité fut déjà admise par WILLSTÄETTER au sujet des diastases (1), mais *a priori* il est difficile à l'admettre. Si les supports colloïdaux peuvent être variables, on conçoit en effet mal comment ceux-ci pourraient conditionner la spécificité. Nous avons cependant vu que le plus souvent lorsqu'on fractionne peu et avec beaucoup de prudence, les supports colloïdaux que l'on isole, forment avec les substances actives des complexes assez stables et bien caractérisés. Ce fait nous a autorisé à admettre que dans les conditions naturelles, et en particulier dans la matière vivante, les relations entre les substances actives et leurs supports colloïdaux sont bien déterminées (p. 117). Ainsi il se peut que le support colloïdal puisse jouer un rôle dans la spécificité des réactions antigéniques et diastasiques et nous allons voir que, si aucune preuve directe ne nous autorise pour le moment à admettre cette hypothèse, les caractères mêmes des réactions antigéniques la rendent probable.

(1) R. WILLSTÄETTER. *Ber. d. d. chem. Ges.*, 53, 3601 (1927). Dans des travaux non encore terminés, nous avons vu que la spécificité, tout au moins pour les antigènes des bacilles tuberculeux et paratuberculeux, est assez variable d'une préparation antigénique à l'autre, d'un antisérum au suivant. Ce fait résulte, vraisemblablement, des relations assez variables entre les supports et les haptènes dans le groupe des bacilles tuberculeux et paratuberculeux.

CHAPITRE II

CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES DES RÉACTIONS ANTIGÉNIQUES (*)

1. — *Nature de la réaction entre antigènes et anticorps.*

Le problème de la relation entre les humeurs, les cellules et les antigènes qui les imprègnent, est très obscur. Une question importante qui concerne la relation entre antigène *in vitro* et antigène *in vivo*, a déjà cependant reçu une réponse précise. L'idée que le groupement chimique qui détermine la formation des anticorps, est le même que celui qui réagit avec ces anticorps circulant dans les humeurs, a été formulée la première fois par P. EHRLICH. Si à un moment donné (question de l'antigène de FORSMANN (1)) la théorie d'EHRLICH fut contestée, les études de LANDSTEINER sur la spécificité des antigènes la remirent en faveur (2).

On ne pourrait par contre répondre avec précision sur le point de savoir quel est le changement que subit le colloïde biologique pour devenir un anticorps et comment ce change-

(*) La discussion qui suit, intéresse d'une façon plus directe les antigènes ; la ressemblance entre ceux-ci et les diastases est cependant tellement frappante que, la question de la catalyse particulière aux diastases mise à part, tout ce que nous trouvons pour l'un des groupes s'appliquera à l'autre. La réaction antigénique est vraisemblablement identique à la première phase de la réaction diastasique et la spécificité de celle-ci dépend presque certainement de cette première phase (réaction entre la diastase et son substrat qui conditionne la catalyse secondaire).

(1) J. FORSMANN et J. FEX. *Biochem. Zeitschr.*, 15, 433 (1908). L'antigène de FORSMANN est l'extrait alcoolique de certains tissus animaux qui est antigène *in vitro* sans être antigène *in vivo*, tandis que l'extrait aqueux de ces mêmes tissus est antigène *in vivo* sans être antigène *in vitro*.

(2) LANDSTEINER et H. LAMPL. *Biochem. Zeitschr.*, 86, 343 (1918).

ment se produit? Il est vraisemblable que dans un premier temps l'antigène étranger à l'espèce est fixé par les cellules et que cette fixation influe sur l'équilibre physique des cellules. On peut de même supposer que la présence de l'antigène étranger, adsorbé par la cellule, intervient dans la synthèse du colloïde humoral qui se produit dans cette cellule. Cette influence pourrait être d'ordre purement physique, de sorte que le colloïde ayant été synthétisé, porterait l'empreinte de l'antigène qui a participé à sa synthèse.

Nous concevons volontiers que toutes ces hypothèses manquent de précision bien que certains faits en attestent la vraisemblance. L'idée que l'influence de l'antigène est purement d'ordre physique, repose en effet sur de nombreux travaux qui tendent à prouver que, d'une part l'antigène ne fait pas partie constitutive de l'anticorps et que, d'autre part les réactions entre antigènes et anticorps *in vitro* sont des réactions d'adsorption.

a) *L'antigène forme-t-il partie constitutive de l'anticorps engendré par lui?*

On a examiné ce problème en traitant des animaux avec des antigènes qui sont faciles à caractériser (certains colorants copulés avec des protéides ou des complexes arsénoprotéidiques dont la spécificité dépend, comme nous le savons, des nouveaux groupements introduits) et on n'a retrouvé aucune trace de l'antigène dans l'anticorps formé (1) et (2). Ainsi l'antigène ne formerait pas partie constitutive de l'anticorps engendré par lui (*).

(1) M. HEIDELBERGER et F. E. KENDALL. *Science*, **72**, 253 (1930).

(2) H. ERLENMAYER et E. BERGER. *Biochem. Ztschr.*, **252**, 22 (1932).

(*) Il faut accepter cette conclusion avec une certaine réserve. En effet les antigènes sont supportés par des systèmes complexes et on ne peut pas démontrer avec certitude qu'une certaine partie de l'antigène ne puisse pas faire partie constitutive de l'antigène. Du point de vue biologique il y a, en tout cas, des relations étroites entre la présence des antigènes dans l'organisme et la formation des anticorps (G. RAMON. *C. R. Soc. Biol.*, **100**, 487; **101**, 630 (1929); **106**, 1218 (1931). *Ann. Institut Pasteur*, **41**, 802 (1927); **44**, 168 (1930)).

b) *Quelle est la nature de la réaction entre antigène et anticorps in vitro ?*

Ce problème fut beaucoup discuté, surtout en ce qui concerne les réactions entre toxine et antitoxine (1) (2).

Tout d'abord il faut considérer les difficultés auxquelles on se heurte souvent quand on cherche à faire la distinction entre forces physiques et forces chimiques, surtout lorsqu'il s'agit de la chimie des colloïdes biologiques. A un autre endroit de notre exposé (p. 20) nous avons montré que les isothermes d'adsorption de LANGMUIR conduisent dans le cas des réactions diastasiques à des formules identiques à celles données par la loi d'action de masse. Cette objection s'appliquera à tous les cas où les lois stœchiométriques ne sont pas directement vérifiables, c'est-à-dire, où on est en présence, comme dans le cas présent, de mélanges complexes de constituants de nature chimique plus ou moins ignorée. Mais même si les lois suivant lesquelles les réactions évoluent, sont différentes des lois simples qui règnent dans les réactions chimiques classiques, le terme d'adsorption ne préjugera au fond en rien sur la nature des forces qui régissent les réactions; elle définira avant tout l'état physique des corps qui réagissent. En effet, ces cas seront réalisés, quand la dispersion du système colloïdal sera soumise à des changements hasardeux qui entraîneront des modifications dans les surfaces disponibles. Les réactions entre les atomes ou les molécules de celles-ci pourront, cependant, provenir de forces de valence primaire.

Cependant, il y a un autre moyen d'étudier les réactions entre antigènes et anticorps, en observant les conditions thermodynamiques proprement dites dans lesquelles ces réactions s'effectuent. Les résultats de ces études ont apporté des faits en faveur de l'hypothèse que ce sont des forces de valence secondaire, telles qu'elles furent définies par LANGMUIR (3) qui

(1) P. EHRLICH. *Deutsche med. Wchschr.*, **24**, 597 (1898).

(2) ARRHENIUS et MADSEN. *Immunochemistry*. Macmillan (1907).

(3) I. LANGMUIR. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 2221 (1916). Cet auteur désigne par le terme de valence résiduelle, des forces qui émanent des atomes chimiquement saturés et qui interviennent dans les réactions physiques de la matière (changements d'état, dissolution, etc.).

interviennent dans les réactions entre antigènes et anticorps *in vitro*. La faible stabilité des complexes de précipitation, la réversibilité complète de ces réactions (1), ne sont pas en faveur de l'hypothèse d'une réaction chimique vraie. L'absence de changements dans l'indice de réfraction dans les réactions sérologiques (2), la complexité et le caractère accidentel des relations quantitatives entre toxines et antitoxines (phénomène de Danysz) plaident plutôt en faveur de réactions d'adsorption (BORDET (3)).

Pour la plupart des antigènes microbiens, leurs propriétés physiques viennent appuyer l'hypothèse suivant laquelle ces principes participent à des réactions de dissolution avec d'autres substances. Ces substances, éminemment adsorbables, n'ont en effet aucune tendance acide ou basique, par conséquent des forces émanant des groupements apolaires (*) doivent jouer un grand rôle dans les réactions qu'elles sont appelées à subir (**).

*
* *

Il est donc permis de supposer que les relations entre antigènes et anticorps *in vitro* et, vraisemblablement, aussi entre antigènes et humeurs ou cellules de l'organisme *in vivo*, sont

(1) A. CALMETTE. *Ann. Inst. Pasteur*, **8**, 275 (1894); MORGENROTH et ASCHER. *Centralbl. f. Bakteriol.*, **59**, 510 (1911); ANDERSON et LÉONARD. *Journ. Amer. Med. Ass.*, **82**, 1679 (1924).

(2) DOERR et BERGER. *Biochem. Ztschr.*, **123**, 144 (1921); BACHMANN. *Zeitschr. f. Immunitäts.*, **35**, 462 (1923).

(3) BORDET et GAY. *Studies on Immunity*, 1919. BORDET fut le premier à admettre que la réaction entre antigène et anticorps est un phénomène d'adsorption.

(*) Ce fait vient à l'encontre d'une hypothèse suivant laquelle les forces qui interviennent dans les réactions immunologiques, seraient des valences werneriennes ; les valences secondaires de Werner doivent en effet intéresser avant tout (ou même exclusivement) les fonctions polaires des matières organiques (les fonctions polaires sont les groupements acide ou amine et en général ceux qui contiennent de l'oxygène, de l'azote ou du soufre (LEWIS. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 762 (1916)).

(**) A ce propos il est intéressant à remarquer que suivant les travaux de M. NICOLLE (*Jour. State Med.* **28**, 393, 1910) et L. MICHAËLIS (et DAVIDSON. *Biochem. Zeitschr.*, **47**, 59 (1912), la charge électrique des particules ne paraît pas avoir d'importance dans les réactions de précipitation et d'agglutination.

réglées par des forces de valence de LANGMUIR. Les réactions entre les antigènes et les constituants des organismes étrangers se rapprocheraient des réactions de dissolution ou d'adsorption apolaire (1).

Cependant le caractère le plus frappant des réactions immunologiques est leur spécificité, dont on pourrait penser *a priori* qu'elle relève avant tout de forces chimiques. Nous allons étudier les caractères de cette spécificité, puis nous allons tâcher de les concilier avec l'hypothèse d'une réaction physique.

2. — *Le problème de la spécificité des antigènes.*

1. — *Spécificité des antigènes naturels.*

Spécificité de l'immunité. — La spécificité stricte qui relie l'anticorps à l'antigène, était la preuve la plus sérieuse en faveur d'une théorie chimique; l'immunité contre les maladies infectieuses en offre un premier exemple. Celle-là dépend certainement des relations d'un mélange complexe de plusieurs antigènes avec un grand nombre d'anticorps différents et, en principe, l'immunité pour une certaine maladie ne comporte presque jamais une immunité pour une autre.

Spécificité des réactions sérologiques.

Ne pouvant passer en revue tous les travaux qui concernent ce sujet, nous nous bornerons à résumer les points les plus importants qui ressortent de ces recherches.

Des études de la spécificité des différents protéides naturels dans leurs réactions de précipitation avec des antisérums homologues ou hétérologues furent conduites principalement

(1) K. LANDSTEINER (*Biochem. Ztschr.*, **50**, 167 (1913)) considère les réactions immunologiques comme étant de nature électrochimique; cette conception est très peu vraisemblable. Les forces qui interviennent dans ces réactions paraissent être les mêmes que celles que nous avons supposé intervenir dans la constitution des colloïdes biologiques (G. SANDOR. *Le problème des protéides*, édit. Doin, 1933, p. 133 et suivantes).

par NUTTALL (1), HEKTOEN (2), UHLENHUT (3), KRUSIUS (4), WELLS et ses collaborateurs (5). Elles ont mis en lumière les faits suivants : la spécificité des antigènes protéidiques est, en général, très stricte. Il existe, cependant, des réactions croisées, mais la réaction la plus intense s'obtient toujours avec l'antigène homologue. L'antigène non spécifique qui réagit, provient en général d'une espèce voisine.

A côté de la spécificité zoologique, il existe une spécificité d'organes : les protéides d'espèces animales différentes, mais provenant d'un même organe, peuvent donner des réactions croisées plus intenses que celles des protéides de la même espèce, mais provenant d'organes différents (exemple classique du cristallin, découvert par UHLENHUT, exemple des kératines, des thyroglobulines, des blancs d'œufs, des laits, etc.).

Comme la spécificité des antigènes repose certainement sur la constitution chimique (LANDSTEINER), les antigènes identiques ou semblables ont une constitution chimique identique ou semblable. La spécificité des antigènes naturels prouve donc que deux caractères morphologiques, la spécificité d'espèce et la convergence des caractères, reposent sur la spécificité de la constitution physico-chimique.

Cependant, ces belles règles ne sont pas toujours vérifiées. Il y a, en effet, des faits troublants de spécificité tout à fait accidentelle. Ces faits concernent surtout les antigènes lipoidiques des tissus et des microbes (FORSSMANN (6), LANDSTEINER et van der SCHEER (7)). Dans ce cas des réactions croisées existent entre des antigènes d'espèces tout à fait éloignées (foie du cobaye et bacille typhique), mais non entre des espèces voisines (cobaye et lapin par exemple). Pour expliquer cette anomalie,

(1) NUTTALL. *Blood immunity and blood relationship*. Cambridge University Press, 1904.

(2) HEKTOEN. *Jour. Amer. Med. Ass.*, 70, 1273 (1918); 80, 386 (1923). *Jour. Inf. Dis.*, 31, 72 (1922).

(3) UHLENHUT. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 4, 761 (1910).

(4) KRUSIUS. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 5, 699 (1910).

(5) WELLS et CHAPMAN. *Jour. Hyg.*, 10, 177 (1910); WELLS. *Jour. Inf. Dis.*, 9, 147 (1911); WELLS et OSBORNE. *Jour. Inf. Dis.*, 29, 200 (1921).

(6) FORSSMANN. *Biochem. Zeitschr.*, 37, 78 (1911).

(7) K. LANDSTEINER et J. van der SCHEER. *Jour. Exper. Med.*, 42, 123 (1925).

LANDSTEINER admet, dans le cas d'une seule cellule, l'existence d'un grand nombre d'haptènes, dont un ou deux pourront être identiques ou semblables pour des espèces très différentes, tandis que la plupart sont différents. Nous allons encore revenir sur ce sujet (p. 136).

II. — *Spécificité des complexes antigéniques ayant subi différents changements chimiques.*

Je serai bref sur ce point, étant donné qu'il a déjà été traité en grande partie (voir p. 33). Nous avons vu, en particulier, que l'introduction de groupements chimiques différents dans les complexes des antigènes protéidiques, confèrent à ceux-ci de nouvelles spécificités très strictes et que ces nouvelles spécificités ne dépendent que des groupements chimiques introduits. LANDSTEINER, partant de l'idée que les réactions immunologiques sont d'ordre électrochimique (1), a étudié l'influence des groupement fortement polaires (des acides organiques) (2). Il fut cependant conduit à conclure que la spécificité immunologique offre des caractères tout à fait particuliers, distincts des caractères de la spécificité chimique classique (2) (3).

Les travaux de LANDSTEINER furent repris et complétés par d'autres auteurs. On a examiné, en particulier, l'influence sur la spécificité de groupements moins franchement polaires que ceux essayés par LANDSTEINER. On a ainsi constaté que des groupements quelconques (méthyle, acéthyle, brome, iode, nitré (4), sucré (5), peuvent déterminer la spécificité des antigènes protéidiques. Il en est de même pour l'isomérisation optique d'après LANDSTEINER (6).

L'étude de l'influence de la nature et du nombre des radicaux introduits avec les différentes substances, précise un caractère singulier de cette spécificité. La comparaison classique d'Emile

(1) K. LANDSTEINER. *Biochem. Zeitschr.*, **50**, 176 (1913).

(2) K. LANDSTEINER. *Biochem. Zeitschr.*, **86**, 343 (1918).

(3) K. LANDSTEINER et J. van der SCHEER. *Jour. Exper. Med.*, **45**, 1045 (1927).

(4) A. WORMALL. *Jour. Exper. Med.*, **51**, 295 (1930).

(5) GOEBEL et AVERY. *Jour. Exper. Med.*, **50**, 521 (1929); **50**, 533 (1929).

(6) K. LANDSTEINER et J. van der SCHEER. *Jour. Exper. Med.*, **48**, 315 (1928); **50**, 407 (1929).

FISCHER au sujet des diastases trouve ici une vérification expérimentale : les anticorps qui réagissent avec les antigènes, doivent avoir par rapport à ceux-ci une configuration comparable à celle « des clés par rapport aux serrures ». La configuration de l'ensemble d'une molécule complexe, c'est-à-dire tous les radicaux et la distribution de ces radicaux, ainsi que leurs relations mutuelles, intervient telle quelle pour déterminer si la réaction entre un antigène et un anticorps aura lieu ou non. Bien plus, les différences spéieliques sont déterminées au moins autant par le nombre et la place des radicaux introduits que par la nature même de ces radicaux (WORMALL). La configuration dans l'espace, la morphologie en quelque sorte des molécules, est dessinée par cette spécificité (1).

(1) H. ERLÉNMEYER et E. BERGER, *Biochem. Zeitschr.*, 252, 22 (1932).

CHAPITRE III

CONCEPTION PHYSICO-CHIMIQUE DES RÉACTIONS ANTIGÉNIQUES

1. — *Insuffisance de la conception chimique.*

Les réactions antigéniques sont vraisemblablement des réactions d'adsorption apolaire qui se font cependant, le plus souvent, avec une spécificité très poussée. En général, les réactions chimiques sont plus spécifiques que les réactions physiques, et la spécificité biologique a souvent orienté les idées vers des théories chimiques. Elle a, cependant, des caractères tout à fait particuliers, différents de ceux de la chimie classique.

Tout d'abord, une théorie chimique simple ne permet pas d'expliquer qu'entre un nombre énorme d'antigènes naturels, les organismes sont capables d'opérer avec une sorte de discernement (p. 130). Il serait, en effet, impossible de supposer que, par exemple, l'union d'une fonction amine de l'antigène avec une fonction carboxylique de l'anticorps puisse offrir une diversité suffisante pour motiver les différences spécifiques qui existent entre toutes les espèces. L'union chimique simultanée de plusieurs groupements de la substance antigène avec plusieurs groupements de l'anticorps, pourrait en donner l'explication, mais cette hypothèse se heurte à une impossibilité chimique quasi-absolue (*).

(*) Dans une réaction chimique un atome, dans une certaine proportion de la concentration totale des molécules, se trouve dans son état critique. La probabilité pour que dans les conditions thermodynamiques considérées, plusieurs atomes d'une même molécule se trouvent simultanément, et dans une proportion sensible, dans leur état critique, est extrêmement faible. Dans l'hypothèse de la réaction chimique simultanée de plusieurs atomes,

D'autre part, le caractère commun de la spécificité diastatique (voir p. 19) et antigéniques (influence mutuelle de plusieurs groupements chimiques très éloignés), n'a que des analogies très grossières avec les caractères de la spécificité classique du domaine physico-chimique (**).

2. — Conception physico-chimique des réactions antigéniques.

La conception chimique paraît donc être insuffisante et il faut chercher une explication physico-chimique. Les réactions physiques de dissolution, d'adsorption, peuvent être spécifiques et l'exposé de LANGMUIR (1) donne la raison de cette spécificité. Cependant, il serait difficile d'expliquer la spécificité biologique par des réactions de dissolution ou d'adsorption banales. BORDET, qui le premier soutint la théorie physique, dit qu'en dehors de la constitution chimique, l'état physique pourrait avoir une influence pour déterminer si une réaction aura lieu (2). Nous

il faudrait d'autre part admettre que la réaction qui s'effectue entre deux ou plusieurs atomes, conditionne et est conditionnée par des réactions entre deux ou plusieurs atomes. Jusqu'à nouvelle preuve, ces hypothèses ne peuvent pas être acceptées.

(**) Nous avons vu que des théories qui expliquent la spécificité par la réaction simultanée de plusieurs groupements, sont inadmissibles. La chimie classique montre par contre des exemples où les réactions dépendent des groupements chimiques qui entourent les fonctions proprement dites qui réagissent. C'est la chimie des esters qui montre ces phénomènes, dits d'empêchement stérique. Ces cas sont cependant tout à fait grossiers (par exemple la différence « spécifique » entre un alcool aliphatique et un alcool cyclique) et l'influence ne s'exerce pas d'ailleurs par des groupements éloignés de la fonction ester. La chimie des complexes de WERNER (A. WERNER. *Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie*. Fr. Vieweg u. Sohn, Braunschweig, 1909) montre un autre exemple de spécificité ; il faudrait dans ce cas supposer que les fonctions polaires sont celles qui déterminent les réactions immunologiques, ce qui ne paraît pas correspondre aux faits. D'autre part, si l'influence de la configuration peut être plus importante pour les réactions werneriennes que pour les réactions chimiques classiques, l'influence simultanée de plusieurs points très distants d'une molécule ne pourrait pas avoir lieu.

(1) I. LANGMUIR. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **36**, 2221 (1916).

(2) J. BORDET. *Immunité, antigènes, anticorps*. Dans le *Traité de Physiologie* de G. H. ROGER, t. VII, édit. Masson, Paris, 1926. En particulier page 404 : « Sans doute peut-on imaginer que l'aptitude soit en rapport aussi bien avec l'état physique qu'avec sa structure chimique ».

pensons aussi que l'état physique peut jouer un rôle important. En réalité il est peu vraisemblable que ce qu'on entend d'ordinaire par ce terme, c'est-à-dire l'état d'agrégation pur et simple du système, puisse être lié au problème de la spécificité. Mais, en posant d'une autre façon cette question d'état physique, nous pouvons trouver une explication logique.

État physique des colloïdes biologiques.

Dans notre précédent travail (1) nous avons réuni de nombreuses preuves en faveur de deux propositions principales concernant la constitution des colloïdes biologiques, en général, et des protéides en particulier : 1^o leur structure micellaire (*) et 2^o leur « rigidité de constitution ».

En effet, ce n'est pas la molécule qui constitue la plus petite particule qui existe dans une solution de protéide naturel ; ce n'est pas non plus un agrégat moléculaire banal, tel que celui qui existe, par exemple, dans un hydrosol d'or. En réalité plusieurs espèces chimiques différentes concourent pour constituer cette particule et les forces qui les unissent, ne sont pas des forces chimiques proprement dites.

Un autre caractère important serait propre à ces micelles complexes. Les unions entre les constituants élémentaires des particules n'auraient pas un caractère accidentel, elles se feraient déjà au lieu de formation (sur la surface ou dans l'intérieur des cellules) des protéides qui garderaient, d'autre part, un équilibre physique particulier. Nous avons défini cet équilibre physique comme une « rigidité de constitution », comme une sorte de faux équilibre cristallin. Les constituants individuels des micelles conserveraient dans l'espace, l'un par rapport à l'autre, une position fixe et invariable.

(1) G. SANDOR. *Le problème des protéides*, édit. Doin, Paris, 1933.

(*) La micelle est la plus petite particule qui constitue les solutions colloïdales en général ; elle est formée d'un agrégat moléculaire (le granule) entouré d'une atmosphère d'ions.

*État physique des colloïdes biologiques
et spécificité antigénique.*

La spécificité du domaine biologique pourrait dépendre de l'état physique particulier des colloïdes biologiques, supports des substances actives antigéniques ou diastasiques. Les réactions seraient déterminées par des forces de valence résiduelle, elles seraient donc des sortes de dissolutions mutuelles de molécules, mais les substances actives qui se dissolvent, seraient liées d'une façon invariable à un ou deux supports colloïdaux. Par la « rigidité de constitution » de ces derniers, les champs de force moléculaire seraient orientés et les adsorptions pourraient se faire avec une spécificité très stricte. D'autre part, la diversité de celle-ci peut résulter de la complexité des micelles protéidiques et de la possibilité de différences spécifiques purement physiques offertes par des polarisations moléculaires, variables d'une micelle à l'autre, mais invariables pour une même micelle. Les réactions d'adsorption pourraient se faire, enfin, à la fois par plusieurs groupements chimiques et cette hypothèse, jointe à la position invariable des radicaux ou des molécules orientés, permet d'expliquer l'influence particulière de la configuration spatiale sur la spécificité. La spécificité du domaine biologique se rapprocherait ainsi de la spécificité cristalline, car les cas d'isomorphisme cristallin (*) sont déterminés par la configuration de tout un complexe moléculaire.

Cette hypothèse explique la spécificité très stricte des antigènes protéidiques et polyholosidiques. Dans ceux-ci, en effet, la substance active est liée, vraisemblablement, d'une façon profonde et invariable au reste des micelles. La spécificité bien moins prononcée de certains autres antigènes constitue aussi une preuve en faveur de cette hypothèse. Les antigènes lipodiques, en général, et tous les antigènes des bacilles tuberculeux que nous avons étudiés (**), sont peu spécifiques et tous ces

(*) Les cristaux isomorphes réunissent dans un même groupe tous les sels complexes qui contiennent le même anion, des cations de même valence et un même nombre de molécules d'eau de cristallisation.

(**) L'antigène lipodique, l'antigène « protéidique » et la tuberculine des bacilles tuberculeux donnent tous les trois des réactions croisées intenses avec les antigènes homologues d'un grand nombre d'autres microbes. D'autre part, la spécificité n'est pas la même pour les différents antisérums et pour les différentes préparations antigéniques.

antigènes ne paraissent être liés que d'une façon peu prononcée et variable à leurs supports colloïdaux (*).

Nous modifions donc la conception de LANDSTEINER (1) dans ce sens qu'au lieu d'admettre l'existence de plusieurs groupements actifs ou d'haptènes différents dans le cas d'un seul antigène, nous supposons qu'il n'y en a qu'un seul ou au maximum deux et que la spécificité des antigènes dépend, tout au moins en partie, des relations entre les haptènes et leurs supports et de la nature chimique de ces derniers.

*
* *

Le matériel diastasique et antigénique des cellules se modifie continuellement et leur faculté de réagir avec des antigènes des cellules étrangères naît souvent devant nos yeux. La spécificité de ce matériel peut donc changer avec une facilité extraordinaire et ce fait caractérise, tout au moins en partie, l'adaptation.

Nous avons vu comment la spécificité antigénique et diastasique pourrait dépendre de la structure pseudo-cristalline des colloïdes biologiques. Des modifications de cette structure pourraient déterminer, d'autre part, l'adaptation des cellules vivantes à de nouveaux aliments ou à de nouveaux antigènes. En effet, la présence accidentelle de substances chimiques déterminées, à l'intérieur ou à la surface des cellules vivantes, pourrait donner une orientation déterminée aux espèces chimiques qui s'unissent pour former un colloïde biologique; cette orientation resterait d'ailleurs gravée dans le complexe résultant en raison de sa « rigidité de constitution ».

Les antigènes et les diastases sont des substances très adsorbables. Des cellules, ils doivent être adsorbés dans les couches superficielles et des humeurs à la surface des cellules.

(*) Ces faits constituent les résultats essentiels de nos recherches sur les antigènes des bacilles tuberculeux (supports colloïdaux variables). En ce qui concerne les antigènes lipoidiques en général, nous savons combien il est facile de leur rendre leur qualité antigénique en les mélangeant simplement à n'importe quel protéide animal. Ils ont donc besoin d'un support colloïdal, mais ce support peut être très variable.

(1) K. LANDSTEINER et J. van der SCHEER. *Jour. Exper. Med.*, 42, 123 (1925).

Les substances, dissoutes dans le milieu qui baigne les cellules, pourraient ainsi facilement influencer la « cristallisation » des colloïdes qui seront les supports des substances actives : diastases ou antigènes. L'adaptation évoluera donc comme un processus de cristallisation entravée, influencée par les forces superficielles des substances étrangères. Les imperfections des cristaux, autant de points de déséquilibre, seront autant de points de force libre épousant l'image des substances qui les ont influencées.

CINQUIÈME PARTIE

RÉSUMÉ ET RAPPEL DES CONCLUSIONS

RÉSUMÉ ET RAPPEL DES CONCLUSIONS

Nous avons étudié quelques substances qui sont élaborées par les bacilles tuberculeux et qui paraissent jouer un rôle important dans l'infection bacillaire. Ces substances sont : les tuberculines, l'antigène contenu dans les protéides du milieu de culture des bacilles (antigène protéidique) et l'antigène entraîné par les substances lipoidiques (antigène lipoidique).

I. — *Tuberculines.*

1° La tuberculine des milieux de culture n'est pas identique aux protéides banaux contenus dans le milieu de culture des bacilles. Elle n'est qu'adsorbée par ces protéides.

2° La tuberculine est une substance relativement simple qui accompagne surtout les protéoses du milieu de culture.

3° L'endotuberculine contenue dans les corps bacillaires accompagne en partie certaines substances lipoidiques par lesquelles elle est vraisemblablement adsorbée. Les propriétés physico-chimiques de cette endotuberculine sont différentes de celles de la tuberculine contenue dans les milieux de culture.

4° Les tuberculines seraient des substances très voisines, peut être même identiques, mais elles seraient excessivement adsorbables et épouseraient les caractères de solubilité des substances par lesquelles elles sont adsorbées.

II. — *Antigène protéidique.*

1° Les protéides contenus dans les milieux de culture des bacilles contiennent de l'antigène lipoidique, cependant ils réagissent en présence des sérums de tuberculeux avec des

anticorps spécifiques différents de ceux qui réagissent avec les antigènes lipoïdiques.

2° Les protéïdes contiennent des polyholosides et ces derniers sont aussi des antigènes fixateurs (haptènes) vis-à-vis des sérums de tuberculeux.

3° Le fractionnement des polyholosides par l'alcool méthylique donne des portions qui fixent très activement le complément et d'autres qui le fixent très peu ou pas du tout.

4° L'haptène polyholosidique paraît réagir avec les mêmes anticorps que l'haptène protéïdique, la spécificité sérologique de ces deux produits est en effet la même.

5° On est ainsi conduit à admettre que les protéïdes et les polyholosides contiennent la même substance antigénique active qui est une impureté. Cette substance, active à une dose infime, serait excessivement adsorbable et épouserait les caractères de solubilité des substances par lesquelles elle est adsorbée.

III. — *Antigène lipoïdique.*

1° Les protéïdes, les polyholosides et les protéoses entraînent tous de l'antigène lipoïdique. Ce dernier apparaît ainsi comme une impureté qui peut très bien conditionner l'activité fixatrice du complément des différents colloïdes biologiques hydrosolubles.

2° L'antigène lipoïdique est une substance excessivement adsorbable.

IV. — *Conclusions générales.*

1° Tous les antigènes que nous avons étudiés, sont des substances excessivement adsorbables et leur adsorbabilité n'a pas de caractère polaire net. Ces principes prennent ainsi les caractères de solubilité des substances par lesquelles elles sont adsorbées. A cause de cette propriété de nombreuses causes d'erreur et de grandes difficultés entourent les travaux de

fractionnement effectués en vue de les isoler et de les caractériser.

2° L'activité antigénique peut être conditionnée par la grande adsorbabilité. En effet, les substances très adsorbables se trouvent de préférence aux surfaces de séparation des phases et peuvent ainsi jouer un rôle important dans les relations entre les cellules et leur ambiance.

Vu : Le Doyen,
BALHAZARD

Vu : Le Président de Thèse,

Liffeneau

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLETY.

卷之五

TABLE DES MATIÈRES

Pages

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION.	1
-----------------------	---

DEUXIÈME PARTIE

RÉSUMÉ DES FAITS ACQUIS ACTUELLEMENT AU SUJET DES DIASTASES ET DES ANTIGÈNES

CHAPITRE PREMIER. — Propriétés physico-chimiques des diastases	8
Généralités.	10
Travaux de l'école de Willstætter.	12
Relations entre protéides et diastases.	16
Spécificité et nature de la réaction.	18
CHAPITRE II. — Antigènes des microbes pathogènes	24
a) Considérations biologiques	25
b) Aspect physico-chimique du problème.	28
Antigènes en général.	28
Antigènes des microbes pathogènes	36

TROISIÈME PARTIE

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX PERSONNELS

(Propriétés physico-chimiques de quelques antigènes des bacilles tuberculeux).	45
---	----

CHAPITRE PREMIER. — Caractères généraux de l'infection bacillaire	47
---	----

CHAPITRE II. — Etude physico-chimique et biologique de la tuber- culine	51
a) Résumé historique	51
b) Relations entre le protéide tuberculinique et l'activité tuber- culinique.	53
Anaphylaxie et allergie	54
Relations physico-chimiques	59
c) Extraction de la tuberculine des corps bacillaires	73
d) Nature physico-chimique de la tuberculine	84

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ANTIGÈNES

	Pages
CHAPITRE III. — Antigène protéidique (Etude physico-chimique et sérologique du protéide tuberculinique).	87
a) Analyse chimique.	88
b) Fractionnement physico-chimique et déterminations sérologiques	89
c) Relations entre les protéides et l'antigène lipoidique	93
d) Relations entre les protéides et les glucides	95
e) Fractionnement du polyholoside	98
f) Fraction anaphylactogène	102
g) Résumé et rappel des conclusions	103
CHAPITRE IV. — Antigène lipoidique (Etude de l'antigène lipoidique sous sa forme soluble dans l'eau).	105
a) Considérations d'ordre général.	105
b) Relations avec les protéides.	107
c) Antigène lipoidique des eaux de macération des bacilles	107
CHAPITRE V. — Conclusions au sujet des antigènes des bacilles tuberculeux	113
a) Extraction de principes azotés des corps bacillaires.	113
b) Hypothèse sur la structure antigénique des bacilles de Koch.	117

QUATRIÈME PARTIE

VUES THÉORIQUES SE RATTACHANT AU PROBLÈME DES ANTIGÈNES

CHAPITRE PREMIER. — Antigènes et diastases	121
a) Place occupée par les antigènes et les diastases	121
b) Relations entre la substance active et son support	123
CHAPITRE II. — Caractères physico-chimiques des réactions antigéniques	125
a) Nature de la réaction <i>in vitro</i>	125
b) Le problème de la spécificité	129
CHAPITRE III. — Conception physico-chimique des réactions antigéniques	133
a) Insuffisance de la conception chimique	133
b) Conception physico-chimique	134

SORTI DES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE BARNÉOUD
= LAVAL (FRANCE) =



197